

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko – biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Tereza Havlová

Tvorba biofilmu u rodu *Mycobacterium*
Biofilm formation in the genus *Mycobacterium*

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Petra Lišková, PhD.

Praha, 2024

Poděkování:

Ráda bych poděkovala RNDr. Petře Liškové, PhD. za její trpělivost, cenné rady a připomínky při vypracovávání této práce.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci vypracovala samostatně, a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 12.12.2024

Podpis:

Abstrakt

Bakteriální rod *Mycobacterium*, je významný rod patřící do kmene *Actinomycetota*. Jsou do něj řazené druhy saprofytické i obligátně parazitické, například *Mycobacterium tuberculosis*. Rod *Mycobacterium* disponuje schopností tvorby biofilmu. Biofilmy jsou mnohobuněčná a trojrozměrná společenstva mikroorganismů, která jsou obalená extracelulární maticí. Na jeho tvorbě se podílejí glykopeptidolipidy, mykolové kyseliny s krátkým řetězcem, monomeromykolyl diacylglycerol, geny podmiňující tvorbu biofilmu a chaperoniny, například GroEL, a isonitrilová lipopeptidová syntetáza. Biofilm umožňuje mykobakteriím výraznou odolnost, například proti chemickým látkám, ochranu, například před imunitním systémem hostitele, a je také jednou z příčin antibiotické rezistence. Biofilmy jsou důležitými faktory patogenity v medicíně nejen kvůli působení antibiotické rezistence, ale také kvůli působení chronických infekcí, kolonizace katetrů a implantátů, kvůli imunomodulačním účinkům a také velmi komplikují diagnostiku maskováním přítomnosti bakterií. V antibiotické rezistenci mykobakterií hraje roli i toxin-antitoxinový systém. Biofilmy lze detekovat mnohými způsoby jako jsou různé mikroskopické metody, například konfokální laserová skenovací mikroskopie, barvicí techniky, například barvení celulózy, a i pomocí hmotnostní spektrofotometrie.

Klíčová slova: *Mycobacterium*, biofilm, rezistence, *Mycobacterium tuberculosis*, antibiotika, adheze, netuberkulózní mykobakterie

Abstract

The bacterial genus *Mycobacterium*, is an important genus belonging to the phylum *Actinomycetota*. It includes both saprophytic and obligately parasitic species, such as *Mycobacterium tuberculosis*. The genus *Mycobacterium* has the ability to form biofilms. Biofilms are multicellular and three-dimensional communities of microorganisms that are encased in an extracellular matrix. Involved in its formation are glycopeptides, short-chain mycolic acids, monomeromycolyl diacylglycerol, biofilm-associated genes and chaperonins such as GroEL and isonitrile lipopeptide synthetase. Biofilms provide mycobacteria with significant resistance, for example to chemicals, protection, for example from the host immune system, and are the cause of antibiotic resistance. Biofilms are important pathogenicity factors in medicine due to the action of antibiotic resistance, but also due to the action of chronic infections, catheter and implant colonisation, due to immunomodulatory effects, and also greatly complicate diagnosis by masking the presence of bacteria. The toxin-antitoxin system also plays a role in the antibiotic resistance of mycobacteria. Biofilms can be detected by many methods such as various microscopic methods such as confocal laser scanning microscopy, staining techniques such as cellulose staining, and even mass spectrophotometry.

Key words: *Mycobacterium*, biofilm, resistance, *Mycobacterium tuberculosis*, antibiotics, adhesion, nontuberculous mycobacteria

Seznam zkratek

AG	arabinogalaktan
AM	alveolární makrofágy
c-di-GMP	cyklický di-guanosinmonofosfát
CL	kardiolipin
CpnT	channel protein with necrosis-inducing toxin
CRA	metoda konžské červeně na agraru
DAT	diacyl trehalózy
DC-SIGN	dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin
DST	diagnostic sensitivity test
eDNA	extracelulární deoxyribonukleová kyselina
EPS	extracelulární polymerní substance
ESI	ionizace elektrosprejem
ESX-1	type VII secretion (T7S) systems
ESAT-6	early secreted antigenic target of 6 kDa (ESAT-6)
EsxA	ESAT-6-like protein A
EsxH	ESAT-6-like protein H
GABA	kyselina gama-aminomáselná
<i>gap</i> , Gap	glykopeptidolipidy adresující protein
GlcNAc	N-acetylglukosaminu
GPL	glykopeptidolipidy
GroEL	60 kDa chaperonin
HGT	horizontální genový přenos
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
IL-1 β	interleukin-1 β
INLP	isonitrilová lipopetdiová syntetáza
KatG	kataláza-peroxidáza
LAM	lipoarabinomannan
LM	lipomannan
MALDI	ionizace laserovou desorpce s asistencí matrice

ManLAM	lipoarabinomannan s dlouhým polymerem manózy
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MmpL	mycobacterial membrane protein large
MOTT	mycobacteria other than tuberculosis
<i>mps, Mps</i>	mycobacterial peptide synthase
mRNA	messenger ribonukleová kyselina
MTC28	mycobacterium tuberculosis complex-specific 28 kDa
NET	neutrofilní extracelulární pasti
NRPs	neribozomální peptidy
NTM	nontuberculous mycobacteria
NuoG	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain G
PAHs	polycyklické aromatické uhlovodíky
PCR	polymerázová řetězová reakce
PDIM	ftiocerolové dimykcerosáty
PE	fosfatidylethanolamin
PG	peptidoglykan
PGL	fenolové glykolipidy
PI	fosfatidylinositol
PIM	fosfatidylinositolové mannosidy
<i>pks</i>	polyketidová syntetáza
(p)ppGpp	guanosine 5'-triphosphate 3'-diphosphate
PS	fosfatidylserin
ROS	reaktivní formy kyslíku
TA	toxin-antitoxin
TCP	metoda tkáňových kultur
TDM	trehalozový dimykolát
TM	zkumavková metoda
TNF	tumor necrosis factor
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
VapC5	virulence-associated protein C5

Obsah

1	Úvod.....	1
2	Charakteristika rodu <i>Mycobacterium</i>	2
2.1	Význam rodu <i>Mycobacterium</i>	2
2.2	Stavba buněčných obalů.....	4
2.2.1	Plazmatická membrána.....	4
2.2.2	Buněčná stěna.....	4
2.2.3	Pouzdro.....	5
3	Obecná definice biofilmu.....	6
4	Struktura biofilmu mykobakterií.....	7
5	Tvorba a růst biofilmu.....	9
5.1.1	Fáze tvorby biofilmu.....	9
5.2	Geny a proteiny podmiňující tvorbu biofilmu.....	11
5.3	Role isonitrilové lipopetidové syntetázy při tvorbě biofilmu.....	13
6	Detekce biofilmu.....	14
7	Význam biofilmu u mykobakterií.....	15
7.1	Mykobakteriální biofilmy v medicíně.....	15
7.1.1	Klinické důsledky přítomnosti biofilmu.....	15
7.1.2	Terapeutické důsledky přítomnosti biofilmu v lidském organismu.....	18
7.2	Bakteriální rezistence a perzistence.....	18
7.2.1	Rezistence k antimikrobiálním látkám u mykobakterií.....	19
7.2.2	Testování citlivosti na antibiotika.....	20
7.2.3	Bakteriální perzistence u mykobakterií.....	20
7.3	Toxin – antitoxin (TA) systém.....	21
7.3.1	Vztah mezi rezistencí, perzistencí a fitness v biofilmu.....	22
8	Závěr.....	23
9	Seznam použité literatury.....	25

1 Úvod

Cílem této bakalářské práce bylo shrnout dosavadní poznatky o bakteriálním rodu *Mycobacterium* a to zejména poznatky ohledně tvorby biofilmu a významu mykobakteriálního biofilmu v medicíně.

Bakteriální rod *Mycobacterium*, je významný rod patřící do kmene *Aktinomycetota*. Do rodu *Mycobacterium* je zařazeno okolo 188 druhů, mezi kterými nalezneme environmentální saprofytické mykobakterie, ale i bakterie obligátně parazitické, jako například *Mycobacterium tuberculosis* nebo *Mycobacterium leprae*. Mykobakterie disponují schopností tvorby biofilmu, který umožňuje výraznou odolnost vůči vlivům prostředí i vůči antimikrobiálním látkám, což je dělá velmi významnými faktory patogenity v medicíně.

V této práci jsou rozebírány charakteristické vlastnosti a význam rodu *Mycobacterium*, stavba cytoplazmatické membrány, buněčné stěny a pouzdra mykobakteriální buňky, které jsou důležitými faktory virulence. Dále je v práci rozebírána charakteristika biofilmů, jejich struktura, dále tvorba a růst, kde jsou v kapitole rozebrány jednotlivé fáze tvorby a čím je tvorba biofilmu podmíněná. V další kapitole jsou vyjmenovány a charakterizovány metody, jakými jsou biofilmy detekovatelné. V poslední nejdelší kapitole, je rozebírán význam biofilmů v medicíně, kde je popisována tuberkulóza, jejímž původcem je *Mycobacterium tuberculosis*, a také onemocnění způsobená netuberkulozními mykobakteriemi. Biofilmy mají význam v medicíně hlavně z terapeutického hlediska, a to z důvodu způsobené antibiotické rezistence. V práci jsou rozebírány příčiny bakteriální rezistence i toxin – antitoxinový systém, mající na rezistenci významný podíl. V práci je také podkapitola věnovaná testování citlivosti na léky u rezistentních bakterií.

2 Charakteristika rodu *Mycobacterium*

Rod *Mycobacterium* zahrnuje okolo 170 druhů, mezi které patří obligátní parazité působící onemocnění u člověka, například *Mycobacterium tuberculosis*, a enviromentální saprofytické mykobakterie, zvané jako netuberkulozní mykobakterie (NTM, nontuberculous mycobacteria), které jsou velice rozšířené. Často se také nazývají jako „mykobakterie jiné, než tuberkulozní“ (MOTT, mycobacteria other than tuberculosis). Netuberkulozní mykobakterie byly izolovány například z přírodních vod, půdy, bahna, ale i z nepasterizovaného másla a mléka (Esteban, García – Coca, 2018*). Mykobakterie se typicky dělí na rychle rostoucí a pomalu rostoucí. Z pomalu rostoucích jsou pro člověka významné *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae* a *Mycobacterium ulcerans*, z rychle rostoucích například *Mycobacterium fortuitum* a *Mycobacterium chelonae* (Rogal, 1990).

Netuberkulozní mykobakterie se dále dělí podle Runyonovy metody, na základě pigmentace kolonií a rychlosti růstu. Dělí se na čtyři skupiny. Skupina 1 fotochromogeny, skupina 2 scotochromogeny, skupina 3 nefotochromogeny a skupina 4 rychle rostoucí organismy. Tato metoda ale není zcela přesná. U různých druhů mykobakterií se může v závislosti na podmínkách vyskytovat několik skupin (Runyon, 1959).

Nejrelevantnější metodou z pohledu klinické mikrobiologie je klasifikace založená na patogenitě pro člověka (Woods, Washington, 1987*).

Mykobakterie jsou nesporeující, nepohyblivé, aerobní, acido – rezistentní bakterie, nejčastěji tvaru tyčinky. Jsou 0,2- 0,6 μm široké a 1-10 μm dlouhé (Payeur, 2014). Barví se metodou podle Ziehla – Neelsena (Shapiro, Hänscheid, 2008).

2.1 Význam rodu *Mycobacterium*

Zástupci rodu *Mycobacterium* patří mezi významné lidské patogeny, zejména *M. tuberculosis*, původce tuberkulózy, a *M. leprae*, původce lepry. Dále zástupci jako *M. avium complex* nebo *M. abscessus*, které se často vyskytují u pacientů s cystickou fibrózou. Mykobakterie jsou také významné v tématu antibiotické rezistence, jelikož se objevuje stále více rezistentních kmenů. K rezistenci jim napomáhá schopnost tvorby biofilmu, který jsou schopny tvořit i in vivo.

Velké množství netuberkulózních mykobakterií (NTM), jako *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum* a *Mycobacterium avium* a mnoho dalších, bylo nalezeno ve formě polymikrobiálních biofilmů v environmentálních vzorcích z vodovodů, sprchových hlavíc a vodovodních kohoutků. Biofilmy NTM jsou vysoce rezistentní k dezinfekci chlórem i ozonem, tudíž představují významné riziko pro veřejné zdraví. Osoby vystavené kontaminované vodě z vodovodu mohou být ohroženy respiračními infekcemi nebo kožními infekcemi způsobenými NTM (Falkinham et al., 2001, Steed, Falkinham, 2006).

Mykobakterie, například *M. vaccae*, nemusí být ve vztahu k člověku a živočichům pouze patogenní, ale mohou být i symbiotické. Nejvýznamnější symbiózou je imunitní symbióza popisovaná Goldilockovým modelem. Jeho pomocí se určuje optimální rovnováha nebo stav mezi dvěma extrémními hodnotami, kde jedna hodnota je příliš nízká a druhá příliš vysoká. Používá se k identifikaci podmínek, při kterých systém nebo proces funguje nejlépe. V tomto případě popisuje rovnováhu mezi mykobakteriemi a imunitní odpovědí hostitele. Mykobakterie kolonizují své lidské hostitele v rovnováze s imunitní odpovědí. Jakékoli narušení této rovnováhy může vyvolat onemocnění. Goldilockův model zdůrazňuje, že jak příliš silná, tak příliš slabá imunitní odpověď může mít pro hostitele negativní důsledky. Imunitní odpověď musí být pro udržení symbiózy na optimální úrovni. Dále mohou být mykobakterie i jako symbionti součástí mikrobiomu kůže a střev. Mohou zde hrát roli v trávení potravy, ale také v obraně proti patogenním bakteriím. Odhaduje se, že až 30 % lidí je kolonizováno mykobakteriemi, z nich 90 % nevykazuje žádné příznaky onemocnění. Vyskytují se i jako symbionti rostlin (Robinson, Huppler, 2017).

Mykobakterie jsou také hojně využívány v metodách genového inženýrství. Mohou být využívány k vývoji nových léčiv jejichž cílem by byly bakteriální cytochromy P450, u mykobakterií například CYP164A (Warrilow et al, 2009). K léčbě mykobakteriálních infekcí by se mohly v budoucnu používat geneticky modifikované bakteriofágy. Geneticky modifikované bakteriofágy neboli mykobakteriofágy mohou specificky cílit na mykobakteriální buňky a lyzovat je. Výzkum ukázal, že některé kmeny fágů, například D29 a DS6A, mohou účinně infikovat a usmrcovat *M. tuberculosis* v laboratorních podmínkách (Yang et al. 2024). Také jsou využívány ve farmaceutickém průmyslu k výrobě meziproduktů steroidních léčiv transformací z fytosterolu (Sripalakit et al., 2006). Některé mykobakterie, jako jsou například *Mycobacterium smegmatis* a *Mycobacterium fortuitum* mají schopnost degradace toxických sloučenin, které by mohli znečišťovat půdy a vodu. Touto sloučeninou jsou například polycyklické aromatické uhlovodíky (PAHs). Využití mykobakterií k čištění

například vody od PAHs je předmětem bioremediačních výzkumů. (Pagnout et al, 2007). Mykobakterie také produkují sekundární metabolity, například neribozomální peptidy (NRPs). Tyto sloučeniny jsou produkovány syntetázami nonribosomálních peptidů a hrají roli v interakci organismu s prostředím a patogenitě (Senate et al. 2019).

2.2 Stavba buněčných obalů

2.2.1 Plazmatická membrána

Stavba buněčných obalů mykobakterií je znázorněna na Obr.1. Pro stavbu mykobakterií je typická plazmatická membrána tvořena z polárních lipidů, které se skládají do dvojvrstvy. Lipidy jsou tvořeny z hydrofilních neboli polárních hlav, jelikož obsahují fosfátovou skupinu jsou nazývány také jako fosfolipidy. Dále jsou polární lipidy tvořeny z řetězců zbytků mastných kyselin s přímým řetězcem nebo z nenasycených a mono-methyl rozvětvených zbytků mastných kyselin, které mají méně než dvacet uhlíků. Nejvýznamnějšími mastnými kyselinami jsou kyselina palmitová, olejová a 10-methyloktadekanoová, nazývané také jako kyselina tuberkulostearová (Ortalo-Magné, 1995). Mykobakterie mají odlišné složení plazmatické membrány od ostatních bakterií, a to zejména kvůli obohacení o mannosylované formy fosfatidylinositolu, známé pod souhrnným označením PIM, které tvoří více než 50 % celkového obsahu lipidů. Přispívají k její strukturální integritě a funkci, což je důležité pro tvorbu biofilmu (Brown et al. 2022). Dalšími složkami jsou fosfatidylinositol (PI), fosfatidylglycerol, fosfatidylserin (PS), fosfatidyletanolamin (PE), kardiolipin (CL) (Brown et al. 2023). Plazmatická membrána ve svém vnějším listu obsahuje lipoglykany jako lipomannan (LM) (Pitargue et al., 2008). Lipomannan je také přítomen v periplazmě, buněčné stěně i v pouzdře. Přítomné lipidy jsou klíčové pro udržení tekutosti a propustnosti membrány. Většina jiných bakterií má jednodušší lipidový profil. Plazmatická membrána obsahuje také proteinové transportéry, například MmpL, které transportují glykopeptidolipidy na povrch buněčné stěny, které hrají klíčovou roli v počátečním upevnění na povrchu a stabilitě biofilmu a jsou nedílnou součástí extracelulární matrice biofilm (Pacheco et al. 2013).

Mezi plazmatickou membránou a buněčnou stěnou se nachází periplazmatický prostor (Chiaradia et al. 2017).

2.2.2 Buněčná stěna

Buněčná stěna mykobakterií se svou stavbou liší od buněčných stěn gram-pozitivních a gram-negativních bakterií. Je to komplex tvořený asymetrickou dvojvrstvou vnější membrány,

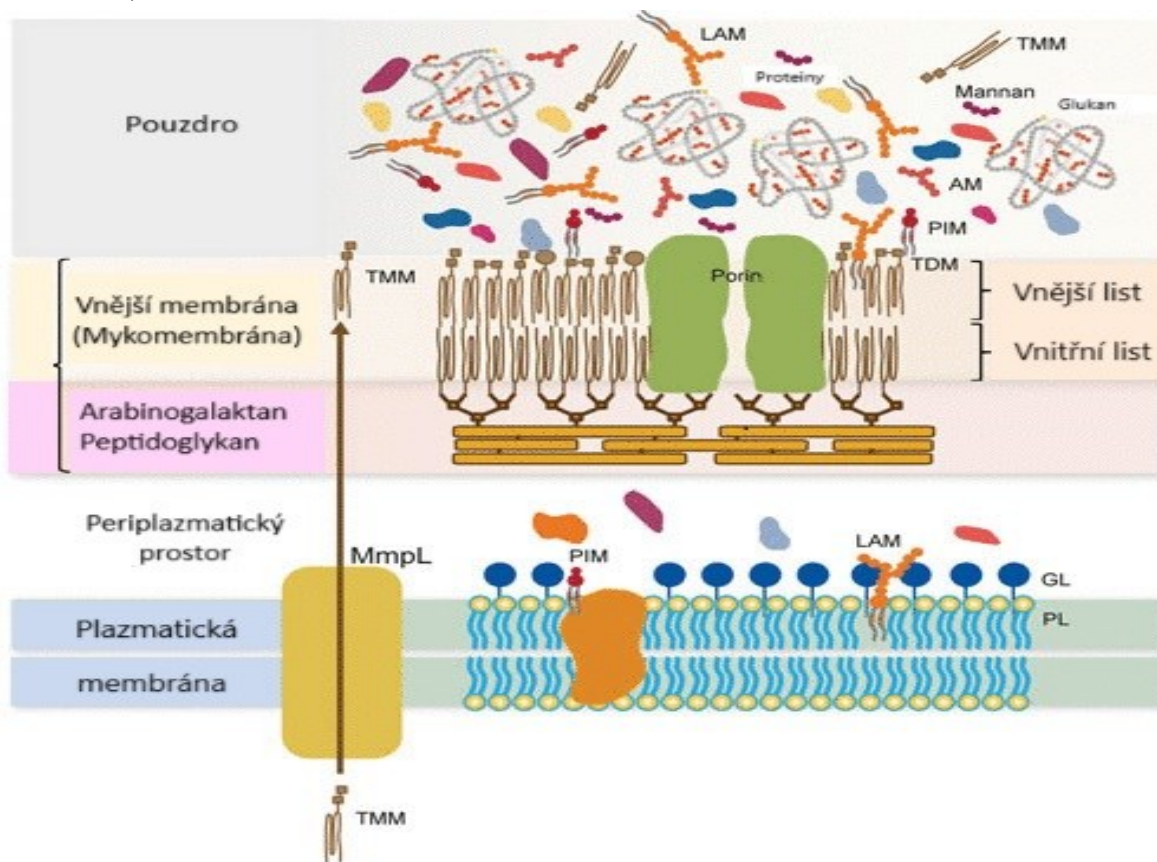
nazývané také jako mykomembrána, arabinogalaktanem (AG) a peptidoglykanem (PG). Její tloušťka je mezi 7-8 nm, tvoří ji peptidoglykan, na který je kovalentně navázán heteropolysacharid arabinogalaktan. Arabinogalaktan je na svých neredukujících koncích esterifikován na α -alkylové, β -hydroxy mykolové kyseliny s dlouhým řetězcem (C60-C90), které jsou k arabinogalaktanu kovalentně navázané a tvoří vnitřní vrstvu mykomebrány. Mykolové kyseliny jsou nezbytné pro vývoj biofilmu. Přispívají k hydrofobní povaze povrchu buněk a podporují mezibuněčné interakce, které usnadňují zrání biofilmu (Zuber et al. 2008). Mykobakteriální peptidoglykan je klasifikován jako A1 γ (klasifikační systém podle Schleifera a Kandlera), což znamená, že se skládá z glykanových vláken tvořených střídajícími se zbytky N-acetylglukosaminu (GlcNAc) a modifikované kyseliny muraminové. Tyto zbytky jsou spolu spojeny v konfiguraci β (1 \rightarrow 4). Tato klasifikace zdůrazňuje strukturní charakteristiky, které odlišují mykobakteriální PG od PG jiných bakteriálních druhů, jako je například vysoký podíl 3-3 příčných vazeb mezi peptidovými řetězci (Alderwick et al. 2015*). Ve vnější vrstvě mykomembrány nacházíme nekovalentně vázané lipidy a lipoglykany, jako jsou fosfatidylinositolové mannosidy (PIM), ftiocerolové dimykocerosáty (PDIM), fenolové glykolipidy (PGL), různé acyltrehalosy, lipoarabinomannan, což je glykolipid obsahující dlouhý polymer manózy (ManLAM) atd (Fukuda et al. 2013). Přítomnost lipidů napomáhá tvorbě extracelulární matrice a zvyšuje stabilitu biofilmu. Nacházíme zde také již zmiňované glykopeptidolipidy (GPL) (Gutiérrez et al. 2018)

Mykomembrána je také bohatá na vosky ve formě mykolových kyselin, voskových esterů, fosfatidyl inositolů a trehalozových dimykolátů (TDM), což znamená, že po obarvení odolává odbarvení okyselenými alkoholy i silnými minerálními kyselinami. Tato vlastnost se nazývá kyselinová rezistence (Sirakova et al. 2012).

2.2.3 Pouzdro

Mezi mykobakteriálními druhy dochází k rozdílným ve složení a procentuálním zastoupení kapsulárních složek. U *M. tuberculosis*, je pouzdro tvořeno polysacharidy, kterými jsou α -D-glukan, D-arabino-D-mannan a D-mannan (Lemassu et al., 1996). Lipidy, které jsou nejvíce vystaveny extracelulárnímu prostoru jsou fosfatidyl-myo-inositol mannosidy (PIM), diacyl trehalózy (DAT), ftiocerol dimykocerosáty (PDIM) a fosfatidylethanolamin (PE). Dále jsou v pouzdře přítomny proteiny, například proteiny z komplexu Ag85, glykopeptidolipidy (Ortalo – Magne et al., 1995).

Polysacharidy pouzdra jsou důležitými faktory virulence a také rezistence mykobakterií. Důležitým imunogenním polysacharidem je arabinomannan. Polysacharidy zprostředkovávají adhezi a průnik do hostitelských buněk, například u *M. tuberculosis* probíhá interakce mezi α -glukanem a DC-SIGN receptory na dendritických buňkách, což umožňuje adhezi a následnou internalizaci (Geurtsen et al., 2009). Z pouzdra jsou vylučovány enzymy zapojené do detoxikace reaktivních meziproductů kyslíku, jako je například peroxidáza a tím se podílejí na rezistenci vůči mikrobicidním mechanismům hostitele. V pouzdře byly také nalezeny toxické lipidy, jako je například trehalóza dimykolát (TDM), a kontaktně závislé lytické látky, které poškozují makrofágy a tím brání fagocytóze a dále zabraňují proliferaci lymfocytů (Stokes et al., 2004).



Obr. 1: Stavba buněčných obalů mykobakteriální buňky (Daffé a Marrakchi 2019, upraveno)

3 Obecná definice biofilmu

Biofilmy jsou mnohobuněčná a trojrozměrná společenstva mikroorganismů, která jsou obalená extracelulární maticí, kterou produkují buňky mikroorganismů. V biofilmu může být přítomen pouze jeden druh bakterií, ale často je v biofilmu přítomno i více druhů bakterií.

Biofilmy nejčastěji vznikají přilnutím bakterií na povrch, ale není to pravidlem (Costerton et al., 1995*).

Tyto povrchy mohou být biotické i abiotické. Z biotických povrchů to mohou být vodní rostliny a živočichové, z abiotických povrchů kameny, plasty, kovy apod (Esteban a García-Coca 2018*).

Bakteriální biofilmy by měli splňovat čtyři základní charakteristiky. První z nich je, že by biofilmy měli být schopné autopoíéze, což je pojem popisující systémy, které produkují a regenerují své vlastní složky, což jim umožňuje udržet se v průběhu času. Druhou je, že by měli být schopné udržovat homeostázu uvnitř biofilmu a tím odolávat změnám prostředí. Třetí charakteristikou je, že by měli biofilmy být schopné synergie, to znamená, že jsou buňky efektivnější ve spojení než jednotlivě. Za čtvrté by měli buňky biofilmu na změny prostředí reagovat jako celek nikoliv jednotlivě (Caldwell et al., 1997*, cit. dle Caldwell et al., 1996 b).

4 Struktura biofilmu mykobakterií

Biofilm mykobakterií je tvořen živými bakteriálními buňkami, perzistentními buňkami i mrtvými buňkami a biofilmovou matricí. Matrice biofilmu je tvořena extracelulárními polymerními substancemi (EPS) produkovanými bakteriemi biofilmu. Základní složkou jsou u mykobakterií bílkoviny. Dále je v biofilmu hojně zastoupena extracelulární DNA (eDNA), která je rozptýlena po biofilmu, zejména v oblastech s nízkým počtem buněk, což poukazuje na to, že má roli v agregaci biofilmu (Dokic et al. 2021). Při ireverzibilní adhezi musí mykobakterie překonat odpudivé síly elektrické dvojvrstvy, která obklopuje bakteriální buňky i povrch. Toho se dosahuje pomocí mechanismů, jako je vylučování extracelulární DNA (eDNA), která může proniknout těmito bariérami a napomáhat přichycení (Campoccia et al., 2021*). Dále lipidy, zejména mykolyl-diacylglycerol, který má vliv na počáteční adhezi, jelikož přispívá k hydrofobnímu charakteru povrchu mykobakterií a taky usnadňuje interakce mezi buňkami. Na povrch buněk je transportován mykolyl-diacylglycerol pomocí Mmpl (Pacheco et al. 2013). Mezi EPS patří také volné mykolové kyseliny, které ovlivňují vývoj a strukturální integritu biofilmu (Dokic et al. 2021), glykopeptidolipidy, které usnadňují mezibuněčné interakce a přispívají k hydrofobní povaze biofilmu (Pacheco et al. 2013). Dále mezi EPS patří fosfatidylmyo-inositol mannosidy (PIM), jejichž množství se při tvorbě biofilmu zvyšuje, což poukazuje na roli při udržování struktury biofilmu, protože bylo prokázáno, že změněná acetylace PIM vede k defektní tvorbě biofilmu

(Li et al. 2020). Poslední složkou EPS jsou polysacharidy, mezi které například u *M. tuberculosis* zejména celulóza (Trivedi et al., 2016). Extracelulární matrice je vysoce hydratovaná. V biofilmu se nachází minimálně 70 % vody. Voda je zde přítomna ve dvou formách, a to vázaná a volná. Vázaná voda je adsorbována na povrch bakterií nebo na struktury matrice biofilmu a hraje klíčovou roli při udržování strukturální integrity a funkčnosti biofilmu. Volná voda není vázaná a může se v biofilmu volněji pohybovat. Přítomnost vody je zásadní pro celkovou architekturu biofilmu a umožňuje tvorbu kanálků a pórů, které usnadňují pohyb živin a signálních molekul v celé struktuře biofilmu (Quan et al. 2022*).

Extracelulární matrice je nezbytná pro strukturální integritu, shlukování buněk (Liu et al., 2008), přilnavost k povrchům (Boks et al., 2008) a ochranu bakteriálního biofilmu, jelikož mu poskytuje značnou odolnost, a to jak chemickou, mechanickou, ale i biologickou ochranu před buňkami imunitního systému. Dále je nezbytná pro výživu biofilmu a jeho hydrataci (Aung et al., 2017).

Pokud se biofilm nachází ve tkáních hostitele, mohou zde být přítomny složky hostitelských tkání (Parsek, Singh, 2003*).

Mykobakterie, jako je *M. abscessus*, mohou vytvářet různé morfotypy, které ovlivňují jejich vzhled biofilmu. Prvním je hladký morfotyp, který má hladký, viskózní vzhled a při pěstování v tekuté kultuře je často popisována jako olejovitá. Má tendenci mít homogennější strukturu. Hrubý morfotyp naopak vykazuje fraktalovitý vzhled s nepravidelnějším a strukturovanějším povrchem a často je popisován jako voskovitý (Clary et al. 2018).

Studie uvádějí, že mykobakteriální biofilmy mohou dosahovat značné tloušťky a mohou pokrývat rozsáhlé plochy. Biofilmy jsou husté a mohou se jevit jako silné vrstvy nebo pelikuly. EPS v mykobakteriálních biofilmech přispívá k jejich vizuálním vlastnostem a vypadá jako gelovitá matrice, která obklopuje bakteriální buňky. Barva mykobakteriálních biofilmů se může lišit v závislosti na konkrétním druhu a podmínkách růstu. Mohou být průsvitné až neprůhledné (Esteban a García-Coca 2018*).

Struktura biofilmu se mění během jeho dozrávání vlivem podmínek prostředí, ve kterém se nachází. Mezi tyto podmínky patří například charakter pohybu tekutin, podmínky růstu, fyzikálně chemické vlastnosti substrátu, dostupnost živin a podobně. Pro strukturu biofilmu jsou také typické vodní kanálky (De Beer et al., 1994).

5 Tvorba a růst biofilmu

Tvorba biofilmu je faktorem patogenicity mykobakterií. Na jeho tvorbě se podílejí glykopeptidolipidy, mykolové kyseliny s krátkým řetězcem, monomeromykoly diacylglycerol, geny podmiňující tvorbu biofilmu a chaperoniny, například GroEL (Zeng et al., 2019), rozebírané v kapitole níže. Na in vitro modelu bylo zjištěno, že na regulaci tvorby biofilmu se podílejí živiny, ionty a zdroje uhlíku tím, že ovlivňují chování bakterií, například na úrovni katabolické represe (Carter et al., 2003). Glykopeptidolipidy byli popsány u všech druhů mykobakterií. Mají stejné složení lipopeptidového jádra, ale jinak se liší v glykosylaci, metylaci nebo acetylaci (Patterson et al., 2000).

5.1.1 Fáze tvorby biofilmu

Jednotlivé fáze tvorby biofilmu jsou znázorněny na Obr. 2. První fází tvorby biofilmu je tzv. reverzibilní přilnutí, kdy planktonní buňky bakterií přiléhají k povrchu prostřednictvím slabých interakcí jako van der Waalsovy síly, elektrostatické interakce a pomocí hydrofobních interakcí. Pokud jsou podmínky nepříznivé, je možné oddělení buněk od povrchu (Muhammad et al. 2020*).

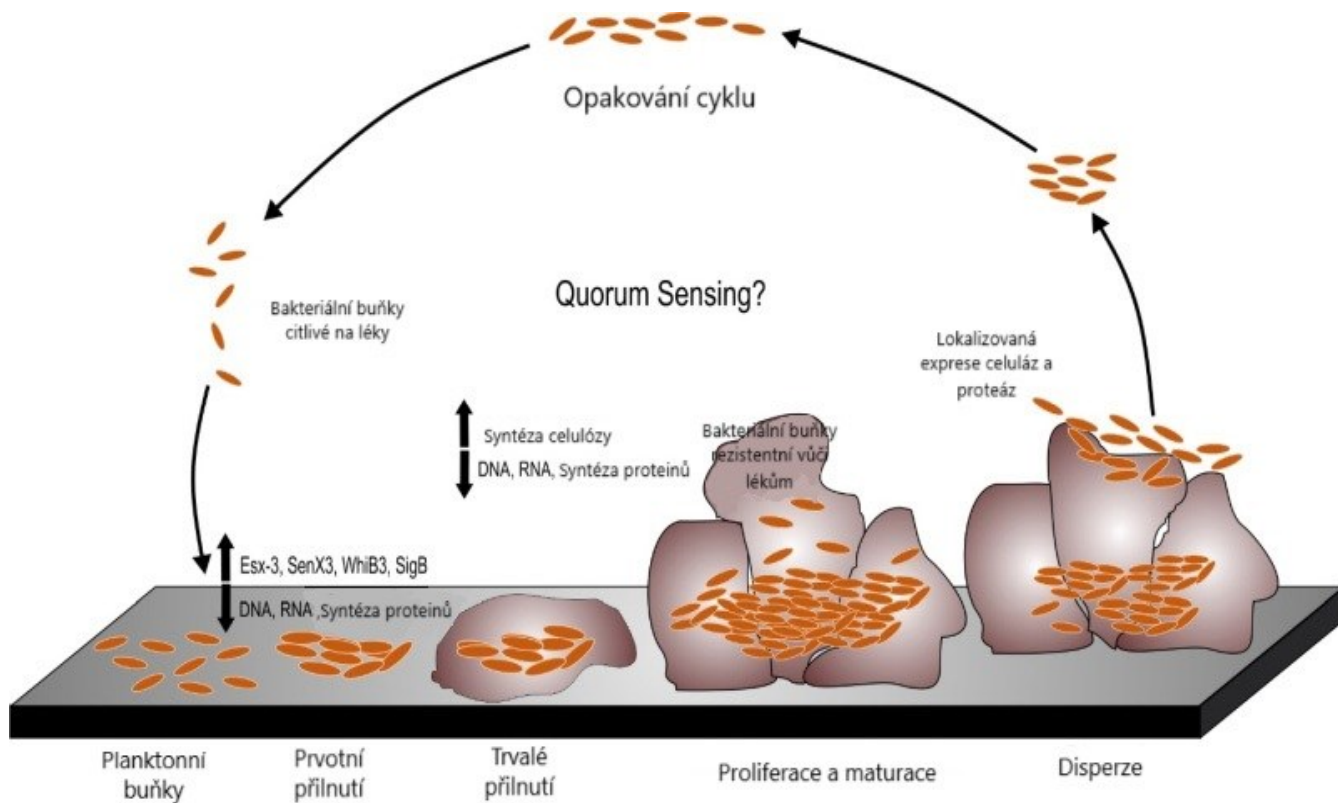
Za příznivých podmínek, jako je dostatek živin a vhodné vlastnosti povrchu (např. hydrofobicita), dochází již za několik minut k druhé fázi, kterou je tzv. ireverzibilní přilnutí mykobakterií k povrchu pomocí adhezínů. Adhezíny mohou mít různou chemickou povahu, včetně proteinů, lipidů, lipoproteinů, glykoproteinů a glykopolymerů a mohou sloužit k specifické adhezi na hostitelské buňky (Vinod et al., 2020*). Po adhezi k povrchu, začínají mykobakterie růst a následně produkovat extracelulární matici, která má za následek zrání biofilmu a poskytuje ochranu vůči vlivům prostředí. Také exprimují geny spojené s tvorbou biofilmu. Adheze je klíčovým dějem při tvorbě biofilmu, a to ze tří důvodů. Za prvé, adheze planktonických bakterií k substrátu je bodem nukleace, což je první krok ve vývoji biofilmu. Druhým důvodem je, že během časného vývoje biofilmu je s největší pravděpodobností potřeba mezibuněčná adheze. Za třetí, extracelulární matrice, která drží buňky v biofilmu pohromadě, vyžaduje pro udržení mechanické stability biofilmu adhezivní interakce (Tsuneda et al., 2003).

Po ireverzibilním přilnutí k povrchu se mykobakterie množí a vytváří malé shluky, zvané mikrokolonie. Tvorbě shluků napomáhá tvorba extracelulárních polymerních substancí, které pomáhají buňky spojovat a také napomáhá zadržování živin okolo mykobakterií a podporuje tak jejich růst (Flemming a Wingender 2010*). Jednotlivé mykobakterie spolu

komunikují prostřednictvím quorum sensing (Waters et al., 2008). Quorum sensing je způsob komunikace mezi bakteriálními buňkami, které umožňuje koordinované chování a regulaci genové exprese související s vývojem biofilmu. Probíhá prostřednictvím specifických signálních molekul, které buňky produkují do okolí a následně na ně reagují. Takovými molekulami jsou za prvé tzv. autoinduktory, které umožňují bakteriím komunikovat mezi sebou na základě hustoty populace a při dosažení prahové koncentrace spouštějí genovou expresi spojenou s tvorbou biofilmu (Mallaiyah, Bramhachari 2018*), dále (p)ppGpp u které bylo prokázáno, že hraje roli v regulaci tvorby biofilmu tím, že ovlivňuje metabolické stavy a stresové reakce v bakteriálních komunitách. Quorum sensing se účastní i druzí posli, například c-di-GMP (Gupta et al., 2015).

Ve čtvrté fázi dochází k dozrávání biofilmu a k tvorbě složité trojrozměrné struktury. Uvnitř biofilmu dochází k tvorbě kanálků, které usnadňují transport živin a jiných látek (Hall-Stoodley et al., 1998*). Během dozrávání mohou mykobakterie také regulovat své metabolické dráhy, což posiluje odolnost např. vůči antibiotikům. Během zrání dochází u mykobakterií k významným změnám genové exprese, které podporují stabilitu a odolnost biofilmu. Geny zapojené do produkce EPS, adheze a reakce na stres jsou často regulovány. Studie například ukázaly, že specifické geny související se syntézou kyseliny mykolové jsou v této fázi klíčové, protože se produkují mykolové kyseliny s kratším řetězcem, které přispívají ke stabilitě biofilmu a k hydrofobnosti matrice, což přispívá k adhezi mezi buňkami. (Dokic et al. 2021). Výzkumy ukazují, že mykobakteriální biofilmy obvykle dozrávají in vitro několik dní. Například u *Mycobacterium smegmatis* se biofilmy mohou tvořit a výrazně dozrávat mezi 3. a 5. dnem po inokulaci, přičemž během tohoto období byly pozorovány změny v metabolické aktivitě (Solokhina et al. 2017).

Poslední fází je disperze, kdy se buňky z biofilmu uvolňují a kolonizují další povrchy. Jedním ze spouštěcích faktorů může být nedostatek živin, který může přinutit bakterie k hledání prostředí s více zdroji. Bylo prokázáno, že dalším spouštěcím faktorem je pokles koncentrace kyseliny gama-aminomáselné (GABA). Při poklesu GABA dochází ke snížení regulace signální molekuly cyklického di-GMP. Disperzi napomáhá aktivita enzymů, například u *M. tuberculosis* protein Rv0062 s celulázovou aktivitou umožňuje hydrolýzu celulozy, která je jednou z hlavních složek extracelulární matrix v mykobakteriálních biofilmech. Celulázovou aktivitou dochází k oslabení matrice biofilmu, což usnadňuje oddělování buněk. Dále také disperzi mohou přispívat enzymy jako glykosidázy a proteázy (Zhang et al. 2024). Důvodem k disperzi je také snaha o kolonizaci dalších povrchů a rozšíření biofilmu.



Obr. 2: Cyklus tvorby a šíření biofilmu (Chakraborty , Kumar 2019, upraveno)

Mykobakteriální biofilmy nemusí být tvořeny pouze jedním druhem mykobakterií. In vivo bylo pozorováno, že v biofilmu mohou být přítomny jak patogenní, tak nepatogenní druhy mykobakterií současně. Z patogenních mykobakterií to mohou být druhy jako *Mycobacterium tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. abscessus* a s netuberkulózní mykobakterií (NTM) například *M. avium* a *M. fortuitum* (Huang et al. 2007). Mohou být také tzv. polymikrobiální, což znamená, že zde mohou být přítomny i další druhy bakterií včetně oportunních patogenů, například za určitých podmínek může s mykobakteriemi koexistovat *Pseudomonas aeruginosa*. In vitro bylo zjištěno, že *P. aeruginosa* a mykobakterie prospívají v prostředí bohatém na živiny, jako je například plicní infekce způsobená cystickou fibrózou, dále se dokáží přizpůsobit hypoxickým podmínkám, které jsou často v biofilmu přítomny. Také EPS produkované *P. aeruginosa* mohou podporovat růst mykobakterií (Rodríguez-Sevilla et al. 2018).

5.2 Geny a proteiny podmiňující tvorbu biofilmu

Mykobakterie jsou typické tím, že nesou dva geny pro chaperon GroEL, *groEL1* a *groEL2*, protože v evoluci došlo ke zdvojení tohoto genu. Geny *groEL1* a *groEL2* přispívají k syntéze příslušných chaperoninových proteinů GroEL1 a GroEL2. GroEL2 s největší pravděpodobností zajišťuje funkci housekeeping chaperonu GroEL, je nezbytný pro obecnou

hemostázu proteinů v buňce. GroEL1 se spojuje s KasA, který je klíčovou složkou syntázy mastných kyselin typu II, která se podílí na syntéze kyseliny mykolové a tím je zajištěna syntéza mykolových kyselin s délkou uhlíkového řetězce v rozmezí C56-C68, které jsou důležité pro strukturální integritu mykobakteriální buněčné stěny (Bhatt et al., 2005). Dále přispívají k hydrofobní povaze buněčného povrchu a usnadňují interakce mezi buňkami, které jsou nezbytné pro vývoj biofilmu (Ojha et al., 2005).

Další z funkcí GroEL1 je, že napomáhá skládání proteinů v buňce, což je nezbytné pro udržení homeostázy proteinů zejména za stresových podmínek, které jsou pro tvorbu biofilmu typické. Ve studii Zeng et al. bylo zjištěno, že kmeny s nedostatkem GroEL1, neboli Cpn60.1, jejichž gen *cpn60.1* byl narušen kazetou podporující rezistenci ke kanamycinu, vykazují abnormální Crabtreeho efekt, jelikož vylučují větší množství pyruvátu. Crabtreeho efekt je inhibice buněčné respirace v důsledku vysoké koncentrace glukosy a vede ke zvýšené hladině intracelulárního pyruvátu a toxických vedlejších produktů, jako je methylglyoxal, který může vyvolat glykolytický stres a bránit vývoji biofilm (Zeng et al. 2019).

Při studiích na *Mycobacterium smegmatis* byla potvrzena aktivita několika významných genů podmiňující tvorbu biofilmu. Prvním genem podmiňujícím tvorbu biofilmu je gen *mps*, který kóduje protein Mps homologní peptidovým syntetázám, což jsou enzymy podílející se na syntéze lipopeptidů neribozomální syntézou. Pravděpodobně usnadňuje postupné přidávání aminokyselin, např. threoninu nebo alaninu, za vzniku lipopeptidového jádra, které může být následně glykosylováno cukry. Tento proces je nezbytný pro tvorbu glykopeptidolipidů (GPL), které jsou důležitou součástí mykobakteriální buněčné stěny a matrix biofilmu. Přispívají k adhezi mezi buňkami a také ke stabilitě ve struktuře biofilmu, jelikož napomáhají udržení hydrofobních interakcí. To zvyšuje celkovou odolnost biofilmu (Yamazaki et al. 2006). Expresi *mps* je regulována na základě environmentálních podmínek, například oxidační stres nebo expozice antibiotikům, mohou spustit regulační cesty, které ovlivňují expresi genu *mps* (Billman – Jacobe et al., 1999).

Dalším genem podmiňující tvorbu biofilmu je gen *pks*. Kóduje polyketidovou syntetázu, která se podílí na syntéze například fenolických glykolipidů (PGL), které jsou klíčové pro strukturální integritu a funkčnost matrice biofilmu, jelikož ovlivňují produkci extracelulárního materiálu. Produkci ovlivňují kvantitativně, jelikož ovlivňují množství extracelulárního materiálu, a i například tloušťku biofilmu, ale kvalitativně, jelikož se podílí na syntéze PGL, které mají vliv na integritu a funkčnost matrice. Expresi *pks* mohou regulovat

různé transkripční faktory, signální dráhy a metabolické stavy, které reagují na změny v prostředí, např. na snížení hladiny kyslíku nebo expozici antibiotik (Pang et al. 2012).

Genem zodpovědným za přenos glykopeptidolipidů (GPL) na povrch mykobakterií je *gap*. Kóduje protein Gap (GPL adresující protein). Expresi *gap* mohou ovlivňovat metabolické potřeby buňky a různé environmentální podněty, kterými mohou být oxidační stres, teplotní šok, hypoxie, nedostatek nebo nadbytek živin, které mění energetický stav buňky (Sondén et al., 2005, Joshi et al., 2024).

Studie Kundu et al., potvrzuje, že antigen MTC28 produkovaný *Mycobacterium tuberculosis* je důležitý pro tvorbu biofilmu a roli jeho $\alpha 1\beta 1$ oblastí ve zvýšené tvorbě biofilmu a také ve vazbě na buněčnou stěnu bakterie (Kundu et al., 2017).

Ve studii Chen et al., bylo potvrzeno, že gen *aceE* u *Mycobacterium smegmatis* se podílí na syntéze kyseliny mykolové a ovlivňuje morfologii kolonií, tvorbu biofilmu a invazi bakterií do makrofágů. Gen *aceE* kóduje E1 komponent pyruvát dehydrogenázy, která katalyzuje přeměnu pyruvátu na acetyl-coA, který je poskytuje zdroj uhlíku pro syntézu kyseliny mykolové (Chen et al., 2020).

5.3 Role isonitrilové lipopetidové syntetázy při tvorbě biofilmu

Isonitrilová lipopetidová syntetáza, zkratkou INLP, je enzym, podílející se na biosyntéze isonitrilových lipopetidů, někdy označovaných pouze jako isonitrily. Je lokalizovaná uvnitř buněk v cytoplazmě jako součást biosyntetického aparátu. Substrátem pro syntézu isonitrilů jsou mastné kyseliny (Del Rio Flores et al. 2023). Geny kódující INLP se nacházejí na chromozomu. Přítomnost isonitrilové lipopetidové syntetázy, produkující isonitrilové lipopeptidy, je typická pro mykobakteriální biofilmy, a je dokázáno, že isonitrilové lipopeptidy jsou nezbytné pro tvorbu a rozvoj biofilmu, jelikož umožňují adaptaci na prostředí a například u *M. tuberculosis* hrají roli v obraně proti imunitnímu systému hostitele. Isonitrilovou lipopeptidovou syntetázu je schopno syntetizovat pět kódujících biosyntetických enzymů mechanismem thio – templátu. Tvorba isonitrilu probíhá z prekursoru glycinem podporovaného thioesterázou a homologem esterázy, který je závislý na nehemovém železe a acylací obou aminoskupin lysinem stejným isonitrilovým acylovým řetězcem. Bylo prokázáno, že enzymy tvořící isonitril v patogenních mykobakteriích mají katalytickou funkci a jsou schopny rozpoznávat substrát. K virulenci a patogenitě mykobakterií INLP přispívá zprostředkováním transportu kovů. Inhibice enzymové aktivity INLP by mohla být strategií v boji proti mykobakteriálním patogenům (Harris et al., 2017).

6 Detekce biofilmu

Při infekčních onemocnění spojených s bakteriemi se schopností tvorby biofilmu nastává několik problémů s jejich detekcí. Diagnostické testy vycházejí často falešně negativní na přítomnost mikroorganismu, protože biofilmy mohou například zabránit přístupu činidel k buňkám nebo je mohou maskovat. Dále nalezené mikroorganismy mohou být nekultivovatelné, jelikož například vyžadují specifické růstové faktory nebo při kultivaci vzniká nízký počet kolonií, odebraný vzorek může být nevhodný, mikroorganismy nemají žádnou anebo mají velmi sníženou antimikrobiální citlivost, například k desinfekčním prostředkům. Dále jsou biofilmy velmi pružné, odolné a přilnavé, což komplikuje odběr vzorku pomocí stěrů pro následnou kultivaci, jelikož množství bakterií ve vzorku nemusí být dostačující (Aparna, Yadav, 2008).

Jednou z metod pro detekci schopnosti tvorby mykobakteriálního biofilmu je metoda tkáňových kultur (TCP). Při této metodě je bakteriální suspenze inokulována do 96jamkové destičky, kde se následně tvoří biofilm. Metoda je kvantitativní a poskytuje měření biomasy biofilmu prostřednictvím barvení, např. krystalovou violetí. Tato metoda má vysokou citlivost a dokáže tak odhalit vysoké procento producentů biofilmu a je tedy spolehlivou metodou pro klinické izoláty (Wilson et al. 2017*).

Další metodou je zkumavková metoda (TM). Je to kvalitativní metoda, při které se bakterie pěstují ve zkumavkách a následně se pro vizualizaci biofilmu barví. Metoda je velmi specifická, ale má nižší citlivost ve srovnání s TCP, jelikož není schopná zachytit všechny producenty biofilmu a také vyhodnocení výsledků probíhá vizuálním posouzením, které může být subjektivní (Medegar, Mansabdar, a Patil 2022).

Metoda konžské červeně na agaru (CRA) používá destičky obsahující barvivo tzv. konžskou červeně, která se váže na polysacharidy produkované buňkami v biofilmu. Výsledky metody, ale občas bývají falešně pozitivní, popřípadě negativní. (Harika et al. 2020).

Další metodou je detekce biofilmů pomocí barvení celulózy kalcofluorovou bělobou. Biofilmy na bázi celulózy tvoří například *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium avium* (Yamamoto et al., 2023).

Dále lze biofilm detekovat pomocí kombinace povrchové proteomiky k identifikaci proteinů vystavených povrchu mykobakteriálního biofilmu, jako je například chaperon GroEL2 (Savijoki et al. 2021).

K detekci biofilmu se také využívá měření hmotnostní spektrofotometrií, kterou lze detekovat a také charakterizovat biologické molekuly ve struktuře EPS. Existují dva druhy hmotnostní spektrofotometrie, kterými jsou ionizace elektrosprejem (ESI) a ionizace laserovou desorpcí s asistencí matrice (MALDI) (Shunmugaperumal, 2010).

Biofilm lze stanovit i molekulárními metodami, například metodou PCR, kterou lze detekovat faktory virulence pomocí amplifikace cílových genů virulence, jako jsou právě geny podílející se na tvorbě biofilmu, s použitím genově specifických primerů, a to i u nekultivovaného patogenu přítomného ve vzorku (Ahmad, 2023).

7 Význam biofilmu u mykobakterií

Bakterie vytváří biofilmy jako mechanismus přežití, tudíž jsou biofilmy všudypřítomné. Umožňuje bakteriím přežít nepříznivé podmínky jako je například působení chemických látek, vysoká teplota nebo vysoké pH. Mykobakterie v biofilmech hrají roli v rozkladu organických toxických látek například polycyklických uhlovodíků (PAHs) (Pagnout et al., 2007).

7.1 Mykobakteriální biofilmy v medicíně

Mykobakteriální biofilmy jsou v medicíně považovány za důležité patogenní faktory při infekčních onemocněních. Během studií například *Mycobacterium tuberculosis* a *Mycobacterium smegmatis* bylo prokázáno, že tvorba biofilmu zvyšuje antibiotickou rezistenci (Ojha et al., 2008). Výskyt multirezistentních a extrémně rezistentních kmenů mykobakterií se stále zvyšuje, zejména v souvislosti s infekcí HIV (World health organization, 2013).

7.1.1 Klinické důsledky přítomnosti biofilmu

7.1.1.1 Onemocnění způsobená netuberkulózními druhy mykobakterií

Netuberkulózní druhy mykobakterií jsou klinicky významné, jelikož způsobují chronická onemocnění, nejčastěji chronická respirační onemocnění. Tato onemocnění jsou ve většině případů způsobena druhy *Mycobacterium avium complex* nebo *Mycobacterium abscessus*. Nejčastěji postihují pacienty například s cystickou fibrózou (Olivier et al., 2003) nebo pacienty, kteří dříve prodělali tuberkulózu nebo silikózu (Churchyard et al., 1999) a mají v plicích různá zjizvení či dutiny, které jsou ideálním prostředím pro kolonizaci prostřednictvím tvorby biofilmu mykobakterií. Dále stavy, například bakteriémie nebo onemocnění, jako je peritonitida způsobená netuberkulózními druhy mykobakterií, byla zachycena u pacientů s dlouhodobě zavedenými katetry (Hawkins, 2008), u pacientů s protetickými klouby nebo

chlopněmi (Bouchiat, 2015) a kardiostimulátory (Al-Ghamdi, 2016). Léčba antibiotiky v těchto případech není dostačující a je nutné katetry a implantáty vyjmout.

7.1.1.2 Onemocnění způsobená *Mycobacterium tuberculosis*

Celosvětově nejznámějším onemocněním způsobené *Mycobacterium tuberculosis* je tuberkulóza. Podle statistik se tuberkulóza řadí mezi nejčastější příčiny úmrtí na světě. Ze statistiky z roku 2022 vyplývá, že v daném roce bylo po celém světě bylo diagnostikováno 10,6 milionu případů a 1,3 milionu úmrtí. Jednou z příčin úmrtí na tuberkulózu je, že pacienti jsou socioekonomicky znevýhodnění, a proto se ke zdravotnické péči dostanou pozdě. Léčba je také velmi zdlouhavá, trvá nejméně 6-9 měsíců a pacienti často léčbu nedokončí. Další příčinou úmrtí je, že *Mycobacterium tuberculosis* je často rezistentní vůči antibiotické léčbě. (World health organization, 2023).

Fáze infekce *M. tuberculosis* byly popsány v práci Chandra et al., 2022 a jsou zobrazeny na Obr. 3. V první fázi infekce dojde k setkáním *M. tuberculosis* s alveolárními makrofágy (AM) v dýchacích cestách, ve kterých je vhodné prostředí pro usídlení a následný rozvoj infekce. Dále *M. tuberculosis* infikuje plicní epiteliální buňky, do jejichž membrán vylučuje virulenční lipidové faktory, jako jsou například ftiocerol dimykoserosát (PDIM) a sulfolipidy. Funkcí virulenčních lipidových faktorů je například modulace imunitní odpovědi. Infikované AM migrují do plicního intersticia. Migraci umožňuje sekreční systém ESX-1 (T7SS) *M. tuberculosis* a jeho efekторы jako EsxA a produkce IL-1 β hostitelským imunitním systémem. Jakmile se *M. tuberculosis* dostane do plicního intersticia, infikuje další makrofágy. Neutrofilny reagují na infekci *M. tuberculosis* produkcí reaktivních forem kyslíku (ROS) a neutrofilních extracelulárních pastí (NET), které způsobují zánět. K usmrcení *M. tuberculosis* makrofágy využívají antimikrobiální mechanismy, jako je autofagie, oxidační stres a fagolysosomální fúze, kterou má *M. tuberculosis* má schopnost inhibovat a tím v makrofágu intracelulárně přežít. Dále má *M. tuberculosis* schopnost detoxikace reaktivních forem kyslíku (ROS) pomocí katalázy-peroxidázy KatG a také inhibuje produkci ROS v makrofázích a neutrofilech pomocí NuoG. Když infikované makrofágy projdou apoptózou, mohou být odstraněny pomocí eferocytózy, která zamezuje šíření patogenu. *M. tuberculosis* využívá faktory virulence, jako jsou EsxA, CpnT a PDIM k indukci nekrózy a podpoře svého šíření. EsxA permeabilizuje fagozomální membránu infikovaných makrofágů, což umožňuje *M. tuberculosis* uniknout do cytosolu. CpnT je vylučovaný toxin, který přímo přispívá k nekróze tím, že zabíjí hostitelské buňky. PDIM moduluje imunitní reakce a může se integrovat do membrán hostitelských buněk, čímž přispívá ke schopnosti bakterií vyhnout se detekci a zničení imunitním systémem. *M.*

biofilmu *M. tuberculosis*, ale v lidských buňkách chybí (Kumar 2016). Dále ve studii Chakraborty et al. prokázali tvorbu biofilmu *M.tuberculosis* v plicní tkáni infikovaných myší a makaků pomocí barvení kalkofluorovou bělobou a fluorescenční sondy zaměřené na celulózu (Chakraborty et al. 2021).

7.1.2 Terapeutické důsledky přítomnosti biofilmu v lidském organismu

Při mykobakteriální infekci se biofilm v lidském těle tvoří například v alveolech nebo bronchách při infekci plic (Molina – Torres et al., 2020), dále se může tvořit v lymfatických uzlinách (Mustafa et al., 2014), v kloubech (Uhel et al., 2019), na povrchu močového traktu (Tunney et al., 1999) nebo na povrchu kůže či v podkožní tkáni (Lan et al., 2014). Biofilm v plicích může vést k chronickým plicním infekcím charakterizovaným tvorbou granulomů, fibrokavitárním onemocněním (Zweijpfenning et al., 2017) a nodulárními bronchiektáziemi (Gochi et al., 2015), v lymfatických uzlinách, v kůži a podobně mohou způsobit chronické kožní infekce, abscesy, a dokonce i diseminované infekce u imunokompromitovaných jedinců (Naito et al., 2023). Biofilm poskytuje mykobakteriím odolnost vůči antibiotikům a jiným antimikrobiálním látkám, která jsou proti mykobakteriím v planktonním stavu běžně účinná. Tím jim umožňují přežít v hostiteli dlouhou dobu, což může vést k chronickým infekcím. Adheze mykobakterií probíhá pomocí specifických adhezínů, například lipoarabinomannanu (LAM), které reagují s receptory, jako jsou toll-like receptory na povrchu hostitelských buněk, například epitelálních buněk (Liu et al., 2022). U chronických infekcích, jako je tuberkulóza, se kolem infikovaných buněk tvoří tzv. granulomy, tvořené směsí imunitních a epiteloidních buněk (specializované buňky pojivové tkáně), které poskytují mykobakteriím ochranu a umožňují dlouhodobé přežití. Tvorba granulomů je reakcí imunitního systému na přítomnost mykobakterií, a tím jim nechtěně poskytuje chráněné prostředí. Tvorba granulomů mykobakteriím poskytuje čas, pro tvorbu biofilmu, a také vhodné prostředí, ve kterém je nízká koncentrace kyslíku a živin, což je signál pro tvorbu biofilmu. Omezená citlivost na léky vede k nedostatečné eradikaci infekčních agens a může způsobit recidivu po ukončení léčby. Dlouhodobé přežívání bakterie v hostiteli a odolávání působení antibiotik vede k vytvoření rezistence (Ulrichs et al., 2004).

7.2 Bakteriální rezistence a perzistence

Mykobakteriální biofilm hraje roli jak v bakteriální resistenci, tak i persistenci.

7.2.1 Rezistence k antimikrobiálním látkám u mykobakterií

Bakteriální buňky biofilmu získávají díky růstu ve složitém a heterogenním prostředí jedinečné fenotypy, nejvýznamnějším je rezistence k antibiotikům (Teng a Dick 2003). Rezistence k antimikrobiálním látkám je definována jako schopnost mikroorganismů, jako jsou bakterie, viry, houby a paraziti odolávat účinkům léků, které byly kdysi účinné při léčbě infekcí způsobených těmito organismy. K této rezistenci dochází tehdy, když si mikroorganismy vyvinou mechanismy, které je chrání před působením antimikrobiálních látek, což vede k selhání léčby a zvýšeným obtížím při zvládnutí infekcí. Rezistence může vzniknout de novo genetickými mutacemi nebo může být do citlivého kmene bakterií přenesena pomocí horizontálního přenosu genů (HGT).

Biofilmu má významný vliv na rezistenci k antimikrobiálním látkám. Biofilm nemá specifitu k určité látce, ale vliv na rezistenci mají jeho chemické a fyzikální vlastnosti, jako je hydrofobicita nebo přítomnost EPS.

Jednou z příčin rezistence je jedinečný buněčný obal bohatý na mykolové kyseliny, který vytváří hydrofobní bariéru, jež omezuje průnik mnoha antibiotik. Tato silná vrstva snižuje propustnost hydrofilních léčiv, což jim ztěžuje dosažení cíle v buňce (Liu, Nikaido 1999). Příčinou bakteriální rezistence ve spojitosti s růstem biofilmu je přítomnost extracelulárních polymerních substancí (EPS) extracelulární matrice. Aby mohly antimikrobiální látky zprostředkovat kontakt s bakterií přes membránové receptory a poriny, musí přes matici proniknout. EPS výrazně zpomalují průnik látek, a to buď prostým zpomalením rychlosti jejich transportu nebo chemickou interakcí a jejich navázáním (Hoyle et al., 1992). Biofilm funguje i jako fyzická bariéra např. proti fagocytujícím buňkám, což umožňuje mykobakteriím přetrvávat v hostitelských tkáních. Prostředí v biofilmech se může změnit na anaerobní a mohou se zde také hromadit vedlejší metabolické produkty, což může mít negativní vliv na účinnost antibiotik (Yam et al. 2020).

Další příčinou rezistence je schopnost mykobakterií produkovat enzymy, které chemicky modifikují antibiotika, čímž je činí neúčinnými, například přidáváním chemických skupin na specifická místa na antibiotiku, což mu brání ve vazbě na jeho cílové místo. Jedním z takových enzymů je například N-acetyltransferáza, která je schopna modifikovat, konkrétně acetylovat, aminoglykosidy nesoucí 2' aminoskupinu v aminoglykosidových antibiotikách (Vetting et al. 2002).

Rezistence může být také důsledkem chromozomálních mutací, které mění zásahové místo antibiotik. Mutace mohou například způsobit nadměrnou expresi nebo modifikaci cílových proteinů, které se podílejí na účinku antibiotik. Také mohou bránit aktivaci „proléčiv“, neaktivních sloučenin, které vyžadují metabolickou přeměnu, aby se staly účinnými. Chromozomální mutace se mohou šířit horizontálním genovým přenosem (Gygli et al. 2017*).

Poslední dobou se věnuje stále větší pozornost efluxním pumpám, jelikož se objevují rezistentní klinické izoláty *M. tuberculosis*, které ale nevykazují žádnou známou mutaci rezistence. Příčina rezistence je tedy přisuzována efluxním pumpám, které aktivně vypuzují antibiotika z buňky dříve, než mohou uplatnit svůj účinek (Louw et al. 2011).

7.2.2 Testování citlivosti na antibiotika

Testování citlivosti na léky u rezistentních druhů mykobakterií v biofilmech se často provádí pomocí pomalého, ale velmi přesného kultivačního testu označovaného zkratkou DST (Diagnostic sensitivity test). Lze ho provádět klasickými standardizovanými postupy na pevných kultivačních mediích, které ale mohou trvat až 12 týdnů, nebo lze DST provádět pomocí automatizovaných systémů na tekutých mediích, které jsou oproti standardizovaným přesnější a rychlejší. Ale i přesto trvá zjištění citlivosti na antibiotika za použití tekutých medií průměrně 2-4 týdny.

V reakci na dlouhý čas při testování výše uvedenými metodami, se vyvinula další metoda testování, a to amplifikace nukleových kyselin, které detekují mutace genů, které jsou zodpovědné za rezistenci, pomocí molekulárně-genetických metod jako je PCR. Jsou to například testy Cepheid GeneXpert, který je schopen detekovat mutace související s rezistencí na rifampicin a dále test Hain MTBDR plus a Abbott RealTime které je schopny detekovat mutace související s rezistencí na rifampicin i isoniazid (World Health Organization, 2011) (Kostera et al., 2018).

Netuberkulózní druhy mykobakterií vykazují v reakci na testování citlivosti na léky výraznou heterogenitu. Proto jsou výsledky jejich testů srovnávány s referenčními technikami jako je mikrodiluce, což je laboratorní technika používaná k určení minimální inhibiční koncentrace (MIC) antimikrobiálních látek proti mikroorganismům (Woods et al., 2011).

7.2.3 Bakteriální perzistence u mykobakterií

Perzistence mykobakterií označuje schopnost podskupiny mykobakteriálních buněk, která není podmíněna genetikou, zůstat v hostiteli životaschopné po delší dobu, navzdory

imunitním reakcím nebo působením antibiotik. Často se nachází ve fyziologicky klidovém stavu. Tento jev je klíčový pro patogenezí např. tuberkulózy a představuje významnou komplikaci léčby, jelikož vede k chronickým infekcím. Mykobakterie mohou přizpůsobit svůj metabolismus v reakci na stres prostředí, což je nezbytné pro jejich přežití v dormantním stavu. To zahrnuje změny, které jim umožňují prosperovat v podmínkách s nízkým obsahem živin nebo v hypoxických podmínkách, které se běžně vyskytují například v granulomech při tuberkulóze (Wang et al. 2019). Příčinou bakteriální perzistence je snížená rychlost růstu a metabolismu organismů žijících v biofilmech, což má za následek snížení rychlosti příjmu antimikrobiální látky buňkou (DuGuid, 1992).

7.3 Toxin – antitoxin (TA) systém

Toxin – antitoxin proteiny hrají významnou roli nejen v bakteriální perzistenci ale i v rezistenci u mykobakterií. Jejich lokusy působí jako efektory dormance a modulují růst za různých stresových podmínek. TA systémy se podílejí na tvorbě perzistentních buněk, které odolávají léčbě antibiotiky, aniž by u nich vznikla genetická mutace. Aktivace specifických TA systémů zvyšuje přežití perzistentních buněk za stresových podmínek, jako je právě expozice antibiotikům. TA systémy přispívají i k celkové rezistenci vůči antibiotikům, jelikož zvyšují schopnost odolávat různým stresovým faktorům, tudíž napomáhají nejen přežít bezprostřední ohrožení, ale i prosperovat v prostředí, kde jsou přítomna antibiotika. Bylo prokázáno, že TA systémy zvyšují odolnost vůči antibiotikům jako je isoniazid (Yang a Walsh 2017*). TA systémy výrazně ovlivňují tvorbu biofilmu, a to několika způsoby. Hrají roli při přechodu z planktonního stadia do přisedlého stadia biofilmu. Podílejí se na regulaci obecné stresové odpovědi, která je pro vývoj biofilmu nezbytná. Mohou také modulovat expresi genů souvisejících s tvorbou biofilmu a tím mají vliv na architekturu a stabilitu biofilmu. Také napomáhají udržovat rovnováhu mezi udržením biofilmu a disperzí buněk do prostoru. TA systémy jsou také spojeny s regulací druhých posílů, jako je c-di-GMP (Karimi et al. 2014).

TA systémy se nacházejí na bakteriálních chromozomech a plazmidech. Každý lokus je tvořen geny, které kódují proteinový toxin – antitoxin pár. Toxinem je obvykle protein, který může inhibovat buněčné procesy jako je translace, transkripce nebo replikace DNA. Například toxin VapC5 u *M. abscessus* štěpí tRNA, což vede k zástavě růstu a umožňuje bakterii přežít působení antibiotik zaměřených na ribozomy (Troian et al. 2023). Antitoxinem může být protein ale i molekula RNA. Antitoxin je méně stabilnější a za specifických stresových podmínek se rozkládá. Jeho rozklad vede k aktivaci příslušného toxinu. TA systémy také

podporují udržení plazmidů kódujících tyto systémy, zabíjením dceřiných buněk, které schopnost kódovat TA systémy ztratily (Gerdes et al., 1986)

Existuje pět typů TA systémů. U mykobakterií je typický typ II, kdy se antitoxin přímo váže na toxin (Shao et al. 2011).

Tyto systémy mají čtyři zásadní vlastnosti. První z nich je uspořádání jejich genů. Gen pro antitoxin se vždy nachází před genem pro toxin, může se s ním buď částečně překrývat anebo mezi sebou mají krátkou intergenovou oblast. Druhou vlastností je, že jejich geny jsou kotranskribovány a většinou i kotranslatovány. Třetí vlastností je, že antitoxin autoreguluje expresi operonu TA na úrovni transkripce, a příslušný toxin působí jako korepresor exprese, když je vázán na párový antitoxin. Čtvrtou vlastností je již zmíněná nestabilita antitoxinu a stabilita toxinu (Korch et al., 2009).

TA systém funguje prostřednictvím RNázové aktivity. Při působení stresových faktorů, antitoxin jejím vlivům podléhá degradaci, což vede ke vzniku aktivního toxinu. Toxin dále reguluje růst buňky, a to například degradací mRNA, replikací DNA nebo syntézou buněčné stěny. Když se podmínky, ve kterých se buňka nachází vrátí do optimálních hodnot, je toxin degradován syntézou nových antitoxinů.

Vliv TA systému na rezistenci mykobakterií vyplívá například ze srovnání *Mycobacterium tuberculosis*, který má 88 lokusů pro TA, a půdního saprofyta *Mycobacterium smegmatis*, který má pouze jeden lokus (Ramage et al., 2009).

Je známo sedm skupin TA lokusů a to jsou *ccd*, *parDE*, *mazEF*, *relBE*, *vapBC*, *phd/doc* a *higBA*, které se navzájem liší mechanismy účinků. Toxiny systémů *relBE*, *higBA*, *mazEF* a *vapBC* působí jako ribonukleázy a inhibují translaci (Pedersen et al., 2003) (Christensen-Dalsgaard, Gerdes, 2006) (Zhang et al., 2003) (Talwar et al., 2020). Systém *phd/doc* působí pravděpodobně také na úrovni translace (Hazan et al., 2001). Toxiny systémů *ccd* a *parDE* jsou jedy gyrázy, který inhibuje replikaci DNA (Dao-Thi et al., 2005) (Jiang et al., 2002). U mykobakterií se nachází systémy *relBE*, *vapBC* a *mazEF* (Pandey, 2005).

7.3.1 Vztah mezi rezistencí, perzistencí a fitness v biofilmu

Geny, které zajišťují fitness biofilmu, např. u *Mycobacterium tuberculosis*, také zajišťují, že je v biofilmu udržována rezistence vůči antibiotikům a to tím, že v biofilmu udržují prostředí, které posilují perzistentní vlastnosti buněk. K regulaci genové exprese genů, pro udržení fitness buňky, využívají již zmíněného quorum sensing. Jak je výše zmíněno,

perzistenci mykobakteriím umožňuje snížení metabolismu a růstové rychlosti jednotlivých buněk, tudíž v biofilmu budou přežívat buňky takto přizpůsobené. Mykobakterie pro přežití v nepříznivých podmínkách také využívají aktivaci specifické stresové odpovědi, jako je produkce stresových proteinů, které buňky chrání před poškozením (Richards et al., 2019).

Mykobakterie mohou získávat nové geny prostřednictvím horizontálního genového transferu (HGT), který umožňuje přenos genů mezi bakteriemi, kterými mohou být právě geny pro rezistenci k antibiotikům nebo geny zvyšující schopnost tvorby biofilmu. HGT je významný pro adaptaci a evoluci bakterií, jelikož umožňuje rychlé šíření výhodných genetických vlastností v bakteriálních populacích. V biofilmu je vysoká hustota buněk bakterií, což je faktor pro účinný HGT. Dále matrix biofilmu udržuje stabilní fyzikální prostředí pro kontakt mezi buňkami, který je nezbytný pro některé mechanismy přenosu genů, a je zdrojem DNA ve formě eDNA (Campoccia et al., 2021). Bylo prokázáno, že konjugace je v biofilmech až 700krát účinnější ve srovnání s volně žijícími bakteriemi (Król et al. 2013). Mykobakteriální genomy jsou také velice plastické, což znamená, že mohou lehce měnit svou genetickou strukturu prostřednictvím mutací, delecí nebo duplikací, což umožňuje adaptaci na různé podmínky (Xia et al., 2023).

8 Závěr

Tato bakalářská práce shrnuje současné poznatky o bakteriálním rodu *Mycobacterium*, o schopnosti tvorby biofilmu a významu mykobakteriálních biofilmů v medicíně, včetně antibiotické rezistence mykobakterií.

V současné době není stále zcela jasné, jak přesně *Mycobacterium tuberculosis* manipuluje imunitní odpověď hostitele. Například přesné mechanismy, které umožňují Mtb přežívat v makrofázích, nejsou plně pochopeny. Tato nejasnost ztěžuje vývoj efektivních vakcín a terapeutik (Young et al., 2023*).

Dále nejsou dostatečně prozkoumány mechanismy, které umožňují *Mycobacterium tuberculosis* přežívat v latentním stavu v hostiteli, což komplikuje vývoj diagnostických metod a preventivních strategií (Salina et al., 2023*).

U multirezistentních kmenů mykobakterií nejsou dostatečně zmapované genetické mutace spojené z rezistencí, což stěžuje vývoj léčiv. Výzkum tuberkulózy je také často

nedostatečně financován ve srovnání s jinými infekčními nemocemi, jako jsou infekce HIV a AIDS a malárie. Nedostatečné financování omezuje pokrok ve vývoji nových diagnostických, terapeutických a preventivních metod (Khan et al., 2016).

Jedním z aktuálních směrů výzkumu u mykobakterií je výzkum zaměřený na diagnostické metody. Mezi tyto výzkumné metody patří Xpert MTB/RIF, která umožňuje rychlou detekci TB DNA a odolnosti vůči rifampicinu do dvou hodin. Tyto testy se osvědčily svou vysokou citlivostí a specifičností, a to i při diagnóze extrapulmonální tuberkulózy (Biset et al., 2024).

Další strategií je inhibice quorum sensing prostřednictvím inhibice syntézy signálních molekul nebo například vazbou na receptory mohou inhibitory blokovat aktivaci genů regulovaných quorum sensing (Naga et al. 2023*).

9 Seznam použité literatury

1. Ahmad, Pishtiwan. „Phenotypic and molecular detection of biofilm formation in methicillin-resistant staphylococcus aureus isolated from different clinical source in erbil city". *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* 15, č. 1 (28. únor 2023): e2023016. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2023.016>.
2. *Alderwick, Luke J., James Harrison, Georgina S. Lloyd, a Helen L. Birch. „The Mycobacterial Cell Wall—Peptidoglycan and Arabinogalactan". *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 5, č. 8 (srpen 2015): a021113. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021113>.
3. Al-Ghamdi, Bandar, Hassan El Widaa, Maie Al Shahid, Mohammed Aladmawi, Jawaher Alotaibi, Aly Al Sanei, a Magid Halim. „Cardiac Implantable Electronic Device Infection Due to Mycobacterium Species: A Case Report and Review of the Literature". *BMC Research Notes* 9, č. 1 (prosinec 2016): 414. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-2221-1>.
4. Aparna, Madhu Sharma, a Sarita Yadav. „Biofilms: Microbes and Disease". *Brazilian Journal of Infectious Diseases* 12, č. 6 (prosinec 2008): 526–30. <https://doi.org/10.1590/S1413-86702008000600016>.
5. Aung, Thet Tun, Wei Hong Jeff Chor, Joey Kuok Hoong Yam, Michael Givskov, Liang Yang, a Roger W. Beuerman. „Discovery of Novel Antimycobacterial Drug Therapy in Biofilm of Pathogenic Nontuberculous Mycobacterial Keratitis". *The Ocular Surface* 15, č. 4 (říjen 2017): 770–83. <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.06.002>.
6. Bhatt, Apoorva, Laurent Kremer, Annie Z. Dai, James C. Sacchetti, a William R. Jacobs. „Conditional Depletion of KasA, a Key Enzyme of Mycolic Acid Biosynthesis, Leads to Mycobacterial Cell Lysis". *Journal of Bacteriology* 187, č. 22 (15. listopad 2005): 7596–7606. <https://doi.org/10.1128/JB.187.22.7596-7606.2005>.
7. Billman-Jacobe, Helen, Malcolm J. McConville, Ruth E. Haites, Svetozar Kovacevic, a Ross L. Coppel. „Identification of a Peptide Synthetase Involved in the Biosynthesis of Glycopeptidolipids of Mycobacterium Smegmatis". *Molecular Microbiology* 33, č. 6 (září 1999): 1244–53. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01572.x>.
8. Biset, Sirak, Milto Teferi, Haylemesikel Alamirew, Biniyam Birhanu, Awoke Dessie, Abebe Aschale, Anmaw Haymanot, et al. „Trends of Mycobacterium Tuberculosis and Rifampicin Resistance in Northwest Ethiopia: Xpert® MTB/RIF Assay Results from 2015 to 2021". *BMC Infectious Diseases* 24, č. 1 (22. únor 2024): 238. <https://doi.org/10.1186/s12879-024-09135-0>.
9. Boks, Niels P., Willem Norde, Henny C. Van Der Mei, a Henk J. Busscher. „Forces Involved in Bacterial Adhesion to Hydrophilic and Hydrophobic Surfaces". *Microbiology* 154, č. 10 (1. říjen 2008): 3122–33. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018622-0>.
10. Bouchiat, Coralie, Julien Saison, Sandrine Boisset, Jean-Pierre Flandrois, Bertrand Issartel, Olivier Dauwalder, Yvonne Benito, et al. „Nontuberculous Mycobacteria: An Underestimated Cause of Bioprosthetic Valve Infective Endocarditis". *Open Forum Infectious Diseases* 2, č. 2 (1. duben 2015): ofv047.

11. Brown, Chelsea M., Robin A. Corey, Ya Gao, Yeol Kyo Choi, Martine Gilleron, Nicolas Destainville, Elizabeth Fullam, Wonpil Im, Phillip J. Stansfeld, a Matthieu Chavent. „From Molecular Dynamics to Supramolecular Organization: The Role of PIM Lipids in the Originality of the Mycobacterial Plasma Membrane", 30. červen 2022. <https://doi.org/10.1101/2022.06.29.498153>.
12. Brown, Chelsea M., Robin A. Corey, Axelle Grélard, Ya Gao, Yeol Kyo Choi, Emanuel Luna, Martine Gilleron, et al. „Supramolecular Organization and Dynamics of Mannosylated Phosphatidylinositol Lipids in the Mycobacterial Plasma Membrane". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120, č. 5 (31. leden 2023): e2212755120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2212755120>.
13. Caldwell DE, Wolfaardt GM, Korber DR, Lawrence JR (1996 b). Cultivation of microbial communities and consortia. In: *Manual of environmental microbiology*. Washington, DC: ASM Press, pp. 1-10.
14. * Caldwell, Douglas E., Elijah Atuku, Darryl C. Wilkie, Kyle P. Wivcharuk, Subramanian Karthikeyan, Darren R. Korber, Dirk F. Schmid, a Gideon M. Wolfaardt. „Germ Theory Vs. Community Theory in Understanding and Controlling the Proliferation of Biofilms". *Advances in Dental Research* 11, č. 1 (duben 1997): 4–13. <https://doi.org/10.1177/08959374970110011501>.
15. * Campoccia, Davide, Lucio Montanaro, a Carla Renata Arciola. „Extracellular DNA (eDNA). A Major Ubiquitous Element of the Bacterial Biofilm Architecture". *International Journal of Molecular Sciences* 22, č. 16 (23. srpen 2021): 9100. <https://doi.org/10.3390/ijms22169100>.
16. Carter, George, Martin Wu, Daryl C. Drummond, a Luiz E. Bermudez. „Characterization of Biofilm Formation by Clinical Isolates of Mycobacterium Avium". *Journal of Medical Microbiology* 52, č. 9 (1. září 2003): 747–52. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05224-0>.
17. Clary, Gillian, Smitha J. Sasindran, Nathan Nesbitt, Laurel Mason, Sara Cole, Abul Azad, Karen McCoy, Larry S. Schlesinger, a Luanne Hall-Stoodley. „Mycobacterium Abscessus Smooth and Rough Morphotypes Form Antimicrobial-Tolerant Biofilm Phenotypes but Are Killed by Acetic Acid". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 62, č. 3 (březen 2018): e01782-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01782-17>.
18. * Costerton, J. William, Zbigniew Lewandowski, Douglas E. Caldwell, Darren R. Korber, a Hilary M. Lappin-Scott. „MICROBIAL BIOFILMS". *Annual Review of Microbiology* 49, č. 1 (říjen 1995): 711–45. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.49.100195.003431>.
19. Chakraborty, Poushali, a Ashwani Kumar. „The extracellular matrix of mycobacterial biofilms: could we shorten the treatment of mycobacterial infections?" *Microbial Cell* 6, č. 2 (4. únor 2019): 105–22. <https://doi.org/10.15698/mic2019.02.667>.
20. Chakraborty, Poushali, Sapna Bajeli, Deepak Kaushal, Bishan Dass Radotra, a Ashwani Kumar. „Biofilm Formation in the Lung Contributes to Virulence and Drug Tolerance of Mycobacterium Tuberculosis". *Nature Communications* 12, č. 1 (11. březen 2021): 1606. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21748-6>.

21. * Chandra, Pallavi, Steven J. Grigsby, a Jennifer A. Philips. „Immune Evasion and Provocation by Mycobacterium Tuberculosis". *Nature Reviews Microbiology* 20, č. 12 (prosinec 2022): 750–66. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00763-4>.
22. Chen, Suting, Tianlu Teng, Shuan Wen, Tingting Zhang, a Hairong Huang. „The aceE Involves in Mycolic Acid Synthesis and Biofilm Formation in Mycobacterium Smegmatis". *BMC Microbiology* 20, č. 1 (prosinec 2020): 259. <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01940-2>.
23. Chiaradia, Laura, Cyril Lefebvre, Julien Parra, Julien Marcoux, Odile Burlet-Schiltz, Gilles Etienne, Maryelle Tropis, a Mamadou Daffé. „Dissecting the Mycobacterial Cell Envelope and Defining the Composition of the Native Mycomembrane". *Scientific Reports* 7, č. 1 (9. říjen 2017): 12807. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-12718-4>.
24. Christensen-Dalsgaard, Mikkel, a Kenn Gerdes. „Two higBA Loci in the Vibrio Cholerae Superintegron Encode mRNA Cleaving Enzymes and Can Stabilize Plasmids". *Molecular Microbiology* 62, č. 2 (říjen 2006): 397–411. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05385.x>.
25. Churchyard, G. J., I. Kleinschmidt, E. L. Corbett, D. Mulder, a K. M. De Cock. „Mycobacterial Disease in South African Gold Miners in the Era of HIV Infection". *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease: The Official Journal of the International Union Against Tuberculosis and Lung Disease* 3, č. 9 (září 1999): 791–98.
26. Daffé, Mamadou, a Hedia Marrakchi. „Unraveling the Structure of the Mycobacterial Envelope". *Editorial Vincent A. Fischetti, Richard P. Novick, Joseph J. Ferretti, Daniel A. Portnoy, Miriam Braunstein, a Julian I. Rood. Microbiology Spectrum* 7, č. 4 (19. červenec 2019): 7.4.1. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.GPP3-0027-2018>.
27. Dao-Thi, Minh-Hoa, Laurence Van Melderen, Erwin De Genst, Hassan Afif, Lieven Buts, Lode Wyns, a Remy Loris. „Molecular Basis of Gyrase Poisoning by the Addiction Toxin CcdB". *Journal of Molecular Biology* 348, č. 5 (květen 2005): 1091–1102. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2005.03.049>.
28. De Beer, Dirk, Paul Stoodley, a Zbigniew Lewandowski. „Liquid Flow in Heterogeneous Biofilms". *Biotechnology and Bioengineering* 44, č. 5 (20. srpen 1994): 636–41. <https://doi.org/10.1002/bit.260440510>.
29. Del Rio Flores, Antonio, Maanasa Narayanamoorthy, Wenlong Cai, Rui Zhai, Siyue Yang, Yuanbo Shen, Kaushik Seshadri, Kyle De Matias, Zhaoqiang Xue, a Wenjun Zhang. „Biosynthesis of Isonitrile Lipopeptide Metallophores from Pathogenic Mycobacteria". *Biochemistry* 62, č. 3 (7. únor 2023): 824–34. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.2c00611>.
30. Dokic, Anja, Eliza Peterson, Mario L. Arrieta-Ortiz, Min Pan, Alessandro Di Maio, Nitin Baliga, a Apoorva Bhatt. „Mycobacterium Abscessus Biofilms Produce an Extracellular Matrix and Have a Distinct Mycolic Acid Profile". *The Cell Surface* 7 (prosinec 2021): 100051. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2021.100051>.
31. Duguid, Ian G., Elwyn Evans, Michael R. W. Brown, a Peter Gilbert. „Effect of Biofilm Culture upon the Susceptibility of Staphylococcus Epidermidis to Tobramycin". *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 30, č. 6 (1992): 803–10. <https://doi.org/10.1093/jac/30.6.803>.

32. * Esteban, Jaime, a Marta García-Coca. „Mycobacterium Biofilms". *Frontiers in Microbiology* 8 (18. leden 2018): 2651. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02651>.
33. Falkinham, Joseph O., Cheryl D. Norton, a Mark W. LeChevallier. „Factors Influencing Numbers of Mycobacterium Avium , Mycobacterium Intracellulare , and Other Mycobacteria in Drinking Water Distribution Systems". *Applied and Environmental Microbiology* 67, č. 3 (březen 2001): 1225–31. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.3.1225-1231.2001>.
34. * Flemming, Hans-Curt, a Jost Wingender. „The Biofilm Matrix". *Nature Reviews Microbiology* 8, č. 9 (září 2010): 623–33. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2415>.
35. Fukuda, Takeshi, Takayuki Matsumura, Manabu Ato, Maho Hamasaki, Yukiko Nishiuchi, Yoshiko Murakami, Yusuke Maeda, et al. „Critical Roles for Lipomannan and Lipoarabinomannan in Cell Wall Integrity of Mycobacteria and Pathogenesis of Tuberculosis". *Editorial William Bishai a Keith P. Klugman. mBio* 4, č. 1 (březen 2013): e00472-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00472-12>.
36. Gerdes, K., F.W. Bech, S.T. Jørgensen, A. Løbner-Olesen, P.B. Rasmussen, T. Atlung, L. Boe, O. Karlstrom, S. Molin, a K. Von Meyenburg. „Mechanism of Postsegregational Killing by the Hok Gene Product of the parB System of Plasmid R1 and Its Homology with the relF Gene Product of the E. Coli relB Operon." *The EMBO Journal* 5, č. 8 (srpen 1986): 2023–29. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1986.tb04459.x>.
37. Geurtsen, Jeroen, Sunita Chedammi, Joram Mesters, Marlène Cot, Nicole N. Driessen, Tounkang Sambou, Ryo Kakutani, et al. „Identification of Mycobacterial α -Glucan As a Novel Ligand for DC-SIGN: Involvement of Mycobacterial Capsular Polysaccharides in Host Immune Modulation". *The Journal of Immunology* 183, č. 8 (15. říjen 2009): 5221–31. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900768>.
38. Gochi, Mina, Noboru Takayanagi, Tetsu Kanauchi, Takashi Ishiguro, Tsutomu Yanagisawa, a Yutaka Sugita. „Retrospective Study of the Predictors of Mortality and Radiographic Deterioration in 782 Patients with Nodular/Bronchiectatic Mycobacterium Avium Complex Lung Disease". *BMJ Open* 5, č. 8 (srpen 2015): e008058. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2015-008058>.
39. Gupta, Kuldeepkumar Ramnaresh, Sanjay Kasetty, a Dipankar Chatterji. „Novel Functions of (p)ppGpp and Cyclic Di-GMP in Mycobacterial Physiology Revealed by Phenotype Microarray Analysis of Wild-Type and Isogenic Strains of Mycobacterium Smegmatis". *Editorial M. Kivisaar. Applied and Environmental Microbiology* 81, č. 7 (duben 2015): 2571–78. <https://doi.org/10.1128/AEM.03999-14>.
40. * Gygli, Sebastian M., Sonia Borrell, Andrej Trauner, a Sebastien Gagneux. „Antimicrobial Resistance in Mycobacterium Tuberculosis: Mechanistic and Evolutionary Perspectives". *FEMS Microbiology Reviews* 41, č. 3 (1. květen 2017): 354–73. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux011>.
41. * Hall-Stoodley, L., C.W. Keevil, a H.M. Lappin-Scott. „Mycobacterium Fortuitum and Mycobacterium Chelonae Biofilm Formation under High and Low Nutrient Conditions". *Journal of Applied Microbiology* 85, č. S1 (prosinec 1998): 60S-69S. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1998.tb05284.x>.
42. Harika, Kala, VishnuPrasad Shenoy, Nagalakshmi Narasimhaswamy, a Kiran Chawla. „Detection of Biofilm Production and Its Impact on Antibiotic Resistance Profile of

- Bacterial Isolates from Chronic Wound Infections". *Journal of Global Infectious Diseases* 12, č. 3 (2020): 129. https://doi.org/10.4103/jgid.jgid_150_19.
43. Harris, Nicholas C., Michio Sato, Nicolaus A. Herman, Frederick Twigg, Wenlong Cai, Joyce Liu, Xuejun Zhu, et al. „Biosynthesis of Isonitrile Lipopeptides by Conserved Nonribosomal Peptide Synthetase Gene Clusters in Actinobacteria". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114, č. 27 (3. červenec 2017): 7025–30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1705016114>.
44. Hawkins, Claudia, Chao Qi, John Warren, a Valentina Stosor. „Catheter-Related Bloodstream Infections Caused by Rapidly Growing Nontuberculous Mycobacteria: A Case Series Including Rare Species". *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 61, č. 2 (červen 2008): 187–91. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.01.004>.
45. Hoyle, Brian D., Clarence K. W. Wong, a J. William Costerton. „Disparate Efficacy of Tobramycin on Ca²⁺ -, Mg²⁺ -, and HEPES-Treated *Pseudomonas Aeruginosa* Biofilms". *Canadian Journal of Microbiology* 38, č. 11 (1. listopad 1992): 1214–18. <https://doi.org/10.1139/m92-201>.
46. Hazan, Ronen, Boaz Sat, Myriam Reches, a Hanna Engelberg-Kulka. „Postsegregational Killing Mediated by the P1 Phage “Addiction Module” Phd-Doc Requires the *Escherichia Coli* Programmed Cell Death System mazEF". *Journal of Bacteriology* 183, č. 6 (15. březen 2001): 2046–50. <https://doi.org/10.1128/JB.183.6.2046-2050.2001>.
47. Jiang, Yong, Joe Pogliano, Donald R. Helinski, a Igor Konieczny. „ParE Toxin Encoded by the Broad-host-range Plasmid RK2 Is an Inhibitor of *Escherichia Coli* Gyrase". *Molecular Microbiology* 44, č. 4 (květen 2002): 971–79. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02921.x>.
48. Joshi, Hemant, Divya Kandari, Subhrangsu Sundar Maitra, Rakesh Bhatnagar, a Nirupama Banerjee. „Identification of genes associated with persistence in *Mycobacterium smegmatis*". *Frontiers in Microbiology* 15 (12. únor 2024): 1302883. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1302883>.
49. Karimi, Sajedeh, Sobhan Ghafourian, Morovat Taheri Kalani, Farid Azizi Jalilian, Saeed Hemati, a Nourkhoda Sadeghifard. „Association Between Toxin-Antitoxin Systems and Biofilm Formation". *Jundishapur Journal of Microbiology* 8, č. 1 (8. prosinec 2014). <https://doi.org/10.5812/jjm.14540>.
50. Korch, Shaleen B., Heidi Contreras, a Josephine E. Clark-Curtiss. „Three *Mycobacterium Tuberculosis* Rel Toxin-Antitoxin Modules Inhibit Mycobacterial Growth and Are Expressed in Infected Human Macrophages". *Journal of Bacteriology* 191, č. 5 (březen 2009): 1618–30. <https://doi.org/10.1128/JB.01318-08>.
51. Kostera, Joshua, Gregor Leckie, Klara Abravaya, a Hong Wang. „Performance of the Abbott RealTime MTB RIF/INH Resistance Assay When Used to Test *Mycobacterium Tuberculosis* Specimens from Bangladesh". *Infection and Drug Resistance* Volume 11 (květen 2018): 695–99. <https://doi.org/10.2147/IDR.S158953>.
52. Król, Jaroslaw E., Andrzej J. Wojtowicz, Linda M. Rogers, Holger Heuer, Kornelia Smalla, Stephen M. Krone, a Eva M. Top. „Invasion of *E. Coli* Biofilms by Antibiotic

- Resistance Plasmids". *Plasmid* 70, č. 1 (červenec 2013): 110–19. <https://doi.org/10.1016/j.plasmid.2013.03.003>.
53. Kumar, Ashwani. „House of cellulose - a new hideout for drug tolerant Mycobacterium tuberculosis". *Microbial Cell* 3, č. 7 (4. červenec 2016): 299–301. <https://doi.org/10.15698/mic2016.07.515>.
54. Kundu, Prasun, Debabrata Dutta, a Amit Kumar Das. „The A1β1 Region Is Crucial for Biofilm Enhancement Activity of MTC 28 in Mycobacterium Smegmatis". *FEBS Letters* 591, č. 20 (říjen 2017): 3333–47. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12823>.
55. Lan, Nguyen Phu Huong, Marion-Eliëtte Kolader, Nguyen Van Dung, James I Campbell, Nguyen Thi Tham, Nguyen Van Vinh Chau, H Rogier Van Doorn, a Dien Hoa Le. „Mycobacterium Fortuitum Skin Infections after Subcutaneous Injections with Vietnamese Traditional Medicine: A Case Report". *BMC Infectious Diseases* 14, č. 1 (prosinec 2014): 550. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0550-z>.
56. Lemassu, Anne, Annick Ortalo-Magné, Fabienne Bardou, Gaby Silve, Marie-Antoinette Lanéelle, a Mamadou Daffé. „Extracellular and Surface-Exposed Polysaccharides of Non-Tuberculous Mycobacteria". *Microbiology* 142, č. 6 (1. červen 1996): 1513–20. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-6-1513>.
57. Lenaerts, Anne J., Donald Hoff, Sahar Aly, Stefan Ehlers, Koen Andries, Luis Cantarero, Ian M. Orme, a Randall J. Basaraba. „Location of Persisting Mycobacteria in a Guinea Pig Model of Tuberculosis Revealed by R207910". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51, č. 9 (září 2007): 3338–45. <https://doi.org/10.1128/AAC.00276-07>.
58. Li, Miaomaio, Henrich Gašparovič, Xing Weng, Si Chen, Jana Korduláková, a Claudia Jessen-Trefzer. „The Two-Component Locus MSMEG_0244/0246 Together With MSMEG_0243 Affects Biofilm Assembly in M. smegmatis Correlating With Changes in Phosphatidylinositol Mannosides Acylation". *Frontiers in Microbiology* 11 (11. září 2020): 570606. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.570606>.
59. Liu, Jun, a Hiroshi Nikaido. „A Mutant of *Mycobacterium Smegmatis* Defective in the Biosynthesis of Mycolic Acids Accumulates Meromycolates". *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96, č. 7 (30. březen 1999): 4011–16. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4011>.
60. Liu, Hui-Hui, Yi-Ran Yang, Xin-Cheng Shen, Zhi-Ling Zhang, Ping Shen, a Zhi-Xiong Xie. „Role of DNA in Bacterial Aggregation". *Current Microbiology* 57, č. 2 (srpen 2008): 139–44. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9166-0>.
61. Liu, Hanrui, Xuwen Gui, Shixing Chen, Weizhe Fu, Xiang Li, Tingyuan Xiao, Jie Hou, a Tao Jiang. „Structural Variability of Lipoarabinomannan Modulates Innate Immune Responses within Infected Alveolar Epithelial Cells". *Cells* 11, č. 3 (21. leden 2022): 361. <https://doi.org/10.3390/cells11030361>.
62. Louw, Gail E., Robin M. Warren, Nicolaas C. Gey Van Pittius, Rosalba Leon, Adelina Jimenez, Rogelio Hernandez-Pando, Christopher R. E. McEvoy, et al. „Rifampicin Reduces Susceptibility to Ofloxacin in Rifampicin-Resistant Mycobacterium Tuberculosis through Efflux". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 184, č. 2 (15. červenec 2011): 269–76. <https://doi.org/10.1164/rccm.201011-1924OC>.

63. * Mallaiah, Devanabanda a Pallaval Veera Bramhachari. „Quorum Sensing in Mycobacterium Tuberculosis: Its Role in Biofilms and Pathogenesis". In *Implication of Quorum Sensing System in Biofilm Formation and Virulence*, editoval Pallaval Veera Bramhachari, 329–35. Singapore: Springer Singapore, 2018. https://doi.org/10.1007/978-981-13-2429-1_22.
64. Medegar, Shobha, Pooja Mansabdar, a Asha B Patil. „An evaluation of three different biofilm detection methods in orthopedic implant associated infections and its implication in healthcare system". *IP International Journal of Medical Microbiology and Tropical Diseases* 8, č. 1 (28. únor 2022): 63–68. <https://doi.org/10.18231/j.ijmmttd.2022.014>.
65. Mishal S. Khan, Helen Fletcher, a Richard Coker, London School of Hygiene and Tropical Medicine TB Centre Steering Committee, „Investments in Tuberculosis Research – What Are the Gaps?" *BMC Medicine* 14, č. 1 (prosinec 2016): 123, s12916-016-0644-0. <https://doi.org/10.1186/s12916-016-0644-0>.
66. Molina-Torres, Carmen Amelia, Oscar Noé Flores-Castillo, Irma Edith Carranza-Torres, Nancy Elena Guzmán-Delgado, Ezequiel Viveros-Valdez, Lucio Vera-Cabrera, Jorge Ocampo-Candiani, Julia Verde-Star, Jorge Castro-Garza, a Pilar Carranza-Rosales. „Ex Vivo Infection of Murine Precision-Cut Lung Tissue Slices with Mycobacterium Abscessus: A Model to Study Antimycobacterial Agents". *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 19, č. 1 (prosinec 2020): 52. <https://doi.org/10.1186/s12941-020-00399-3>.
67. * Muhammad, Musa Hassan, Aisha Lawan Idris, Xiao Fan, Yachong Guo, Yiyan Yu, Xu Jin, Junzhi Qiu, Xiong Guan, a Tianpei Huang. „Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches". *Frontiers in Microbiology* 11 (21. květen 2020): 928. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00928>.
68. Mustafa, Tehmina, Nils Anders Leversen, Lisbet Sviland, a Harald Gotten Wiker. „Differential in Vivo Expression of Mycobacterial Antigens in Mycobacterium Tuberculosisinfected Lungs and Lymph Node Tissues". *BMC Infectious Diseases* 14, č. 1 (prosinec 2014): 535. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-535>.
69. * Naga, Nourhan G., Dalia E. El-Badan, Khaled M. Ghanem, a Mona I. Shaaban. „It Is the Time for Quorum Sensing Inhibition as Alternative Strategy of Antimicrobial Therapy". *Cell Communication and Signaling* 21, č. 1 (14. červen 2023): 133. <https://doi.org/10.1186/s12964-023-01154-9>.
70. Naito, Maiko, Kentaro Fukushima, Shinsuke Kusakabe, Takaya Endo, Takayuki Shiroyama, Kika Ohira, Koji Azuma, et al. „Disseminated Non-Tuberculous Mycobacterial Infection Caused by Mycobacterium Obuense in an Immunocompromised Patient: A Case Report". *BMC Infectious Diseases* 23, č. 1 (8. srpen 2023): 517. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08510-7>.
71. Ojha, Anil, Mridula Anand, Apoorva Bhatt, Laurent Kremer, William R. Jacobs, a Graham F. Hatfull. „GroEL1: A Dedicated Chaperone Involved in Mycolic Acid Biosynthesis during Biofilm Formation in Mycobacteria". *Cell* 123, č. 5 (prosinec 2005): 861–73. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.09.012>.
72. Ojha, Anil K., Anthony D. Baughn, Dhinakaran Sambandan, Tsungda Hsu, Xavier Trivelli, Yann Guerardel, Anuradha Alahari, Laurent Kremer, William R. Jacobs, a

- Graham F. Hatfull. „Growth of Mycobacterium Tuberculosis Biofilms Containing Free Mycolic Acids and Harboring Drug-tolerant Bacteria". *Molecular Microbiology* 69, č. 1 (červenec 2008): 164–74. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06274.x>.
73. Olivier, Kenneth N., David J. Weber, Richard J. Wallace, Ali R. Faiz, Ji-Hyun Lee, Yansheng Zhang, Barbara A. Brown-Elliott, et al. „Nontuberculous Mycobacteria: I: Multicenter Prevalence Study in Cystic Fibrosis". *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 167, č. 6 (15. březen 2003): 828–34. <https://doi.org/10.1164/rccm.200207-678OC>.
74. Ortalo-Magne, A., M.-A. Dupont, A. Lemassu, A. B. Andersen, P. Gounon, a D. Mamadou. „Molecular Composition of the Outermost Capsular Material of the Tubercle Bacillus". *Microbiology* 141, č. 7 (1. červenec 1995): 1609–20. <https://doi.org/10.1099/13500872-141-7-1609>.
75. Pacheco, Sophia A., Fong-Fu Hsu, Katelyn M. Powers, a Georgiana E. Purdy. „MmpL11 Protein Transports Mycolic Acid-Containing Lipids to the Mycobacterial Cell Wall and Contributes to Biofilm Formation in Mycobacterium Smegmatis". *Journal of Biological Chemistry* 288, č. 33 (srpen 2013): 24213–22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.473371>.
76. Pagnout, Christophe, Gilles Frache, Pascal Poupin, Benoît Maunit, Jean-François Muller, a Jean-François Férard. „Isolation and Characterization of a Gene Cluster Involved in PAH Degradation in Mycobacterium Sp. Strain SNP11: Expression in Mycobacterium Smegmatis Mc2155". *Research in Microbiology* 158, č. 2 (březen 2007): 175–86. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2006.11.002>.
77. Pandey, D. P. „Toxin-Antitoxin Loci Are Highly Abundant in Free-Living but Lost from Host-Associated Prokaryotes". *Nucleic Acids Research* 33, č. 3 (18. únor 2005): 966–76. <https://doi.org/10.1093/nar/gki201>.
78. Pang, Jennifer M., Emilie Layre, Lindsay Sweet, Ashley Sherrid, D. Branch Moody, Anil Ojha, a David R. Sherman. „The Polyketide Pks1 Contributes to Biofilm Formation in Mycobacterium Tuberculosis". *Journal of Bacteriology* 194, č. 3 (únor 2012): 715–21. <https://doi.org/10.1128/JB.06304-11>.
79. * Parsek, Matthew R., a Pradeep K. Singh. „Bacterial Biofilms: An Emerging Link to Disease Pathogenesis". *Annual Review of Microbiology* 57, č. 1 (říjen 2003): 677–701. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.57.030502.090720>.
80. Patterson, John H., Malcolm J. McConville, Ruth E. Haites, Ross L. Coppel, a Helen Billman-Jacobe. „Identification of a Methyltransferase from Mycobacterium Smegmatis Involved in Glycopeptidolipid Synthesis". *Journal of Biological Chemistry* 275, č. 32 (srpen 2000): 24900–906. <https://doi.org/10.1074/jbc.M000147200>.
81. Payeur, J.B. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Second Edition. 2014 [cit. 2024-02-22]. ISBN 978-0-12-384733-1.
82. Pedersen, Kim, Andrey V. Zavalov, Michael Yu. Pavlov, Johan Elf, Kenn Gerdes, a Måns Ehrenberg. „The Bacterial Toxin RelE Displays Codon-Specific Cleavage of mRNAs in the Ribosomal A Site". *Cell* 112, č. 1 (leden 2003): 131–40. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)01248-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)01248-5).
83. Policy Statement: Automated Real-Time Nucleic Acid Amplification Technology for Rapid and Simultaneous Detection of Tuberculosis and Rifampicin Resistance: Xpert

MTB/RIF System. WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee. Geneva: World Health Organization, 2011.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK304235/>.

84. *Quan, Kecheng, Jiapeng Hou, Zexin Zhang, Yijin Ren, Brandon W. Peterson, Hans-Curt Flemming, Christian Mayer, Henk J. Busscher, a Henny C. Van Der Mei. „Water in Bacterial Biofilms: Pores and Channels, Storage and Transport Functions". *Critical Reviews in Microbiology* 48, č. 3 (4. květen 2022): 283–302. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2021.1962802>.
85. Ramage, Holly R., Lynn E. Connolly, a Jeffery S. Cox. „Comprehensive Functional Analysis of Mycobacterium Tuberculosis Toxin-Antitoxin Systems: Implications for Pathogenesis, Stress Responses, and Evolution". Editoval Susan M. Rosenberg. *PLoS Genetics* 5, č. 12 (11. prosinec 2009): e1000767. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000767>.
86. Richards, Jacob P., Wenlong Cai, Nicholas A. Zill, Wenjun Zhang, a Anil K. Ojha. „Adaptation of Mycobacterium Tuberculosis to Biofilm Growth Is Genetically Linked to Drug Tolerance". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 63, č. 11 (listopad 2019): e01213-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01213-19>.
87. Robinson, Richard T., a Anna R. Huppler. „The Goldilocks Model of Immune Symbiosis with Mycobacteria and Candida Colonizers". *Cytokine* 97 (září 2017): 49–65. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.05.015>.
88. Rodríguez-Sevilla, Graciela, Marta García-Coca, David Romera-García, John Jairo Aguilera-Correa, Ignacio Mahillo-Fernández, Jaime Esteban, a Concepción Pérez-Jorge. „Non-Tuberculous Mycobacteria Multispecies Biofilms in Cystic Fibrosis: Development of an in Vitro Mycobacterium Abscessus and Pseudomonas Aeruginosa Dual Species Biofilm Model". *International Journal of Medical Microbiology* 308, č. 3 (duben 2018): 413–23. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.03.003>.
89. Rogall, T., J. Wolters, T. Flohr, a E. C. Bottger. „Towards a Phylogeny and Definition of Species at the Molecular Level within the Genus Mycobacterium". *International Journal of Systematic Bacteriology* 40, č. 4 (1. říjen 1990): 323–30. <https://doi.org/10.1099/00207713-40-4-323>.
90. Runyon, Ernest H. „Anonymous Mycobacteria in Pulmonary Disease". *Medical Clinics of North America* 43, č. 1 (leden 1959): 273–90. [https://doi.org/10.1016/S0025-7125\(16\)34193-1](https://doi.org/10.1016/S0025-7125(16)34193-1).
91. * Salina, Elena G. „Mycobacterium Tuberculosis Infection: Control and Treatment". *Microorganisms* 11, č. 4 (18. duben 2023): 1057. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11041057>.
92. Savijoki, Kirsi, Henna Myllymäki, Hanna Luukinen, Lauri Paulamäki, Leena-Maija Vanha-aho, Aleksandra Svorjova, Ilkka Miettinen, et al. „Surface-Shaving Proteomics of Mycobacterium Marinum Identifies Biofilm Subtype-Specific Changes Affecting Virulence, Tolerance, and Persistence". Editoval Tricia A. Van Laar. *mSystems* 6, č. 3 (29. červen 2021): e00500-21. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00500-21>.
93. Senate, Louisa Moshoeshe, Martin Phalane Tjatji, Kayla Pillay, Wanping Chen, Ntokozo Minenhle Zondo, Puleng Rosinah Syed, Fanele Cabangile Mnguni, et al. „Similarities, Variations, and Evolution of Cytochrome P450s in Streptomyces versus

- Mycobacterium". *Scientific Reports* 9, č. 1 (8. březen 2019): 3962. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40646-y>.
94. Shao, Yucheng, Ewan M. Harrison, Dexi Bi, Cui Tai, Xinyi He, Hong-Yu Ou, Kumar Rajakumar, a Zixin Deng. „TADB: A Web-Based Resource for Type 2 Toxin–Antitoxin Loci in Bacteria and Archaea". *Nucleic Acids Research* 39, č. suppl_1 (1. leden 2011): D606–11. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq908>.
95. Shapiro, Howard M., a Thomas Häscheid. „Fuchsin Fluorescence in Mycobacterium Tuberculosis: The Ziehl–Neelsen Stain in a New Light". *Journal of Microbiological Methods* 74, č. 2–3 (srpen 2008): 119–20. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.04.005>.
96. Shunmugaperumal T. *Biofilm Eradication and Prevention: A Pharmaceutical Approach to Medical Device Infections*. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.; 2010. pp. 116-151 ISBN: 978-1-118-04355-4
97. Sirakova, Tatiana D., Chirajyoti Deb, Jaiyanth Daniel, Harminder D. Singh, Hedia Maamar, Vinod S. Dubey, a Pappachan E. Kolattukudy. „Wax Ester Synthesis Is Required for Mycobacterium Tuberculosis to Enter In Vitro Dormancy". *Editoval Anil Kumar Tyagi. PLoS ONE* 7, č. 12 (14. prosinec 2012): e51641. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0051641>.
98. Solokhina, Anna, David Brückner, Gernot Bonkat, a Olivier Braissant. „Metabolic Activity of Mature Biofilms of Mycobacterium Tuberculosis and Other Non-Tuberculous Mycobacteria". *Scientific Reports* 7, č. 1 (23. srpen 2017): 9225. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10019-4>.
99. Sondén, Berit, Dana Kocíncová, Caroline Deshayes, Daniel Euphrasie, Lamya Rhayat, Françoise Laval, Claude Frehel, Mamadou Daffé, Gilles Etienne, a Jean-Marc Reyrat. „Gap, a Mycobacterial Specific Integral Membrane Protein, Is Required for Glycolipid Transport to the Cell Surface". *Molecular Microbiology* 58, č. 2 (říjen 2005): 426–40. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04847.x>.
100. Sripalakit, Pattana, Uthai Wichai, a Aurasorn Saraphanchotiwitthaya. „Biotransformation of Various Natural Sterols to Androstenones by Mycobacterium Sp. and Some Steroid-Converting Microbial Strains". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 41, č. 1–2 (červenec 2006): 49–54. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2006.04.007>.
101. Steed, Keesha A., a Joseph O. Falkinham. „Effect of Growth in Biofilms on Chlorine Susceptibility of Mycobacterium Avium and Mycobacterium Intracellulare". *Applied and Environmental Microbiology* 72, č. 6 (červen 2006): 4007–11. <https://doi.org/10.1128/AEM.02573-05>.
102. Stokes, Richard W., Raymond Norris-Jones, Donald E. Brooks, Terry J. Beveridge, Dan Doxsee, a Lisa M. Thorson. „The Glycan-Rich Outer Layer of the Cell Wall of Mycobacterium Tuberculosis Acts as an Antiphagocytic Capsule Limiting the Association of the Bacterium with Macrophages". *Infection and Immunity* 72, č. 10 (říjen 2004): 5676–86. <https://doi.org/10.1128/IAI.72.10.5676-5686.2004>.
103. Talwar, Sakshi, Manitosh Pandey, Chandresh Sharma, Rintu Kutum, Josephine Lum, Daniel Carbajo, Renu Goel, et al. „Role of VapBC12 Toxin-Antitoxin Locus in Cholesterol-Induced Mycobacterial Persistence". *Editoval Theodore M. Flynn*.

- mSystems 5, č. 6 (22. prosinec 2020): e00855-20. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00855-20>.
104. Teng, Raymond, a Thomas Dick. „Isoniazid Resistance of Exponentially Growing *Mycobacterium Smegmatis* Biofilm Culture". *FEMS Microbiology Letters* 227, č. 2 (říjen 2003): 171–74. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00584-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00584-6).
 105. Trivedi, Abhishek, Parminder Singh Mavi, Deepak Bhatt, a Ashwani Kumar. „Thiol Reductive Stress Induces Cellulose-Anchored Biofilm Formation in *Mycobacterium Tuberculosis*". *Nature Communications* 7, č. 1 (25. duben 2016): 11392. <https://doi.org/10.1038/ncomms11392>.
 106. Troian, Eduardo A., Heather M. Maldonado, Unnati Chauhan, Valdir C. Barth, a Nancy A. Woychik. „*Mycobacterium Abscessus* VapC5 Toxin Potentiates Evasion of Antibiotic Killing by Ribosome Overproduction and Activation of Multiple Resistance Pathways". *Nature Communications* 14, č. 1 (22. červen 2023): 3705. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-38844-4>.
 107. Tsuneda, Satoshi, Hirotohi Aikawa, Hiroshi Hayashi, Atsushi Yuasa, a Akira Hirata. „Extracellular Polymeric Substances Responsible for Bacterial Adhesion onto Solid Surface". *FEMS Microbiology Letters* 223, č. 2 (červen 2003): 287–92. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00399-9](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00399-9).
 108. Tunney, Michael M., David S. Jones, a Sean P. Gorman. „[41] Biofilm and Biofilm-Related Encrustation of Urinary Tract Devices". In *Methods in Enzymology*, 310:558–66. Elsevier, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)10043-0](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)10043-0).
 109. Uhel, Fabrice, Gregory Corvaisier, Yves Poinignon, Catherine Chirouze, Guillaume Beraud, Olivier Grossi, Nicolas Varache, Cédric Arvieux, Rozenn Le Berre, a Pierre Tattevin. „*Mycobacterium Tuberculosis* Prosthetic Joint Infections: A Case Series and Literature Review". *Journal of Infection* 78, č. 1 (leden 2019): 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2018.08.008>.
 110. Ulrichs, Timo, George A Kosmiadi, Vsevolod Trusov, Sabine Jörg, Lydia Pradl, Marina Titukhina, Vladimir Mishenko, Nadya Gushina, a Stefan He Kaufmann. „Human Tuberculous Granulomas Induce Peripheral Lymphoid Follicle-like Structures to Orchestrate Local Host Defence in the Lung". *The Journal of Pathology* 204, č. 2 (říjen 2004): 217–28. <https://doi.org/10.1002/path.1628>.
 111. Vetting, Matthew W., Subray S. Hegde, Farah Javid-Majd, John S. Blanchard, a Steven L. Roderick. „Aminoglycoside 2'-N-acetyltransferase from *Mycobacterium tuberculosis* in complex with coenzyme A and aminoglycoside substrates". *Nature Structural Biology* 9, č. 9 (září 2002): 653–58. <https://doi.org/10.1038/nsb830>.
 112. * Vinod, Vivek, Sukhithasri Vijayrajratnam, Anil Kumar Vasudevan, a Raja Biswas. „The Cell Surface Adhesins of *Mycobacterium Tuberculosis*". *Microbiological Research* 232 (únor 2020): 126392. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126392>.
 113. Wang, Ruojun, Kaj Kreutzfeldt, Helene Botella, Julien Vaubourgeix, Dirk Schnappinger, a Sabine Ehrt. „Persistent *Mycobacterium Tuberculosis* Infection in Mice Requires PerM for Successful Cell Division". *eLife* 8 (21. listopad 2019): e49570. <https://doi.org/10.7554/eLife.49570>.
 114. Warrilow, Andrew G. S., Colin J. Jackson, Josie E. Parker, Timothy H. Marczyklo, Diane E. Kelly, David C. Lamb, a Steven L. Kelly. „Identification, Characterization,

- and Azole-Binding Properties of Mycobacterium Smegmatis CYP164A2, a Homolog of ML2088, the Sole Cytochrome P450 Gene of Mycobacterium Leprae". *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53, č. 3 (březen 2009): 1157–64. <https://doi.org/10.1128/AAC.01237-08>.
115. Waters, Christopher M., Wenyun Lu, Joshua D. Rabinowitz, a Bonnie L. Bassler. „Quorum Sensing Controls Biofilm Formation in *Vibrio Cholerae* through Modulation of Cyclic Di-GMP Levels and Repression of *vpsT*". *Journal of Bacteriology* 190, č. 7 (duben 2008): 2527–36. <https://doi.org/10.1128/JB.01756-07>.
 116. Weitzman, I, D Osadczyi, M L Corrado, a D Karp. „Mycobacterium Thermoresistibile: A New Pathogen for Humans". *Journal of Clinical Microbiology* 14, č. 5 (listopad 1981): 593–95. <https://doi.org/10.1128/jcm.14.5.593-595.1981>.
 117. *Wilson, Christina, Rachel Lukowicz, Stefan Merchant, Helena Valquier-Flynn, Jeniffer Caballero, Jasmin Sandoval, Macduff Okuom, et al. „Quantitative and Qualitative Assessment Methods for Biofilm Growth: A Mini-Review". *Research & Reviews. Journal of Engineering and Technology* 6, č. 4 (prosinec 2017): <http://www.rrrij.com/open-access/quantitative-and-qualitative-assessment-methods-for-biofilm-growth-a-minireview-.pdf>.
 118. * Woods, G. L., a J. A. Washington. „Mycobacteria Other than Mycobacterium Tuberculosis: Review of Microbiologic and Clinical Aspects". *Clinical Infectious Diseases* 9, č. 2 (1. březen 1987): 275–94. <https://doi.org/10.1093/clinids/9.2.275>.
 119. Woods, Gail L., Barbara A. Brown-Elliott, Patricia S. Conville, Edward P. Desmond, Geraldine S. Hall, Grace Lin, Gaby E. Pfyffer, et al. *Susceptibility Testing of Mycobacteria, Nocardiae, and Other Aerobic Actinomycetes*. 2nd vyd. CLSI Standards: Guidelines for Health Care Excellence. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute, 2011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544374/>.
 120. World Health Organization. *Global Tuberculosis Report 2013*. WHO/HTM/TB/2013.11. Geneva: World Health Organization, 2013. <https://iris.who.int/handle/10665/91355>.
 121. World Health Organ. 2023. *Global Tuberculosis Report*. Geneva: World Health Organ. [1.2 TB mortality \(who.int\)](https://www.who.int/tb)
 122. Xia, Xuhua. „Horizontal Gene Transfer and Drug Resistance Involving Mycobacterium Tuberculosis". *Antibiotics* 12, č. 9 (25. srpen 2023): 1367. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12091367>.
 123. Yam, Yee-Kuen, Nadine Alvarez, Mei-Lin Go, a Thomas Dick. „Extreme Drug Tolerance of Mycobacterium abscessus “Persisters”". *Frontiers in Microbiology* 11 (4. březen 2020): 359. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00359>.
 124. Yamamoto, Kentaro, Yusuke Tsujimura, a Manabu Ato. „Catheter-Associated Mycobacterium Intracellulare Biofilm Infection in C3HeB/FeJ Mice". *Scientific Reports* 13, č. 1 (10. říjen 2023): 17148. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44403-0>.
 125. Yamazaki, Yoshitaka, Lia Danelishvili, Martin Wu, Molly MacNab, a Luiz E. Bermudez. „Mycobacterium Avium Genes Associated with the Ability To Form a Biofilm". *Applied and Environmental Microbiology* 72, č. 1 (leden 2006): 819–25. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.819-825.2006>.

126. *Yang, Qiu E., a Timothy R. Walsh. „Toxin–Antitoxin Systems and Their Role in Disseminating and Maintaining Antimicrobial Resistance". *FEMS Microbiology Reviews* 41, č. 3 (1. květen 2017): 343–53. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux006>.
127. Yang, Fan, Alireza Labani-Motlagh, Jose Alejandro Bohorquez, Josimar Dornelas Moreira, Danish Ansari, Sahil Patel, Fabrizio Spagnolo, et al. „Bacteriophage Therapy for the Treatment of Mycobacterium Tuberculosis Infections in Humanized Mice". *Communications Biology* 7, č. 1 (9. březen 2024): 294. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06006-x>.
128. * Young, Carly, Mbali N. Mkhonza, a Paul Ogongo. „Recognition and control of Mycobacterium tuberculosis-infected cells: from basics to the clinic: a NIAID/WGNV workshop report 2023". *Frontiers in Tuberculosis* 1 (15. listopad 2023): 1303505. <https://doi.org/10.3389/ftubr.2023.1303505>.
129. Zeng, Sheng, Patricia Constant, Dong Yang, Alain Baulard, Philippe Lefèvre, Mamadou Daffé, Ruddy Wattiez, a Véronique Fontaine. „Cpn60.1 (GroEL1) Contributes to Mycobacterial Crabtree Effect: Implications for Biofilm Formation". *Frontiers in Microbiology* 10 (11. červen 2019): 1149. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01149>.
130. Zhang, Yonglong, Junjie Zhang, Klaus P Hoeflich, Mitsuhiro Ikura, Guoliang Qing, a Masayori Inouye. „MazF Cleaves Cellular mRNAs Specifically at ACA to Block Protein Synthesis in Escherichia Coli". *Molecular Cell* 12, č. 4 (říjen 2003): 913–23. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00402-7](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00402-7).
131. Zhang, Jiaqi, Yingying Liu, Junxing Hu, Guangxian Leng, Xining Liu, Zailin Cui, Wenzhen Wang, Yufang Ma, a Shanshan Sha. „Cellulase Promotes Mycobacterial Biofilm Dispersal in Response to a Decrease in the Bacterial Metabolite Gamma-Aminobutyric Acid". *International Journal of Molecular Sciences* 25, č. 2 (15. leden 2024): 1051. <https://doi.org/10.3390/ijms25021051>.
132. Zuber, Benoît, Mohamed Chami, Christine Houssin, Jacques Dubochet, Gareth Griffiths, a Mamadou Daffé. „Direct Visualization of the Outer Membrane of Mycobacteria and Corynebacteria in Their Native State". *Journal of Bacteriology* 190, č. 16 (15. srpen 2008): 5672–80. <https://doi.org/10.1128/JB.01919-07>.
133. Zweijpfenning, Sanne, Stephan Kops, Cecile Magis-Escurra, Martin J. Boeree, Jakko Van Ingen, a Wouter Hoefsloot. „Treatment and Outcome of Non-Tuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease in a Predominantly Fibro-Cavitary Disease Cohort". *Respiratory Medicine* 131 (říjen 2017): 220–24. <https://doi.org/10.1016/j.rmed.2017.08.031>.

*sekundární citace